

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANGELA CRISTINA IKEDA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E GENÉTICA DE BACTÉRIAS
ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE RAÍZES DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE MILHO
(*Zea mays* L.)**

CURITIBA

2010

ANGELA CRISTINA IKEDA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E GENÉTICA DE BACTÉRIAS
ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE RAÍZES DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE MILHO
(*Zea mays* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Lygia Vitória Galli Terasawa

Co-orientadoras: Dr^a Mariangela Hungria e Prof^a Dr^a Maria Berenice Reynaud Steffens

CURITIBA
2010

À minha família
Oscar, Silvana,
Mônica, Priscila
e Elder
Por todo amor

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná e aos professores do Departamento de Genética pela oportunidade e pela valiosa contribuição em minha formação

À Prof^a. Dr^a. Lygia Vitória Galli Terasawa pela acolhida, orientação, confiança e amizade

À Prof^a Dr^a Maria Berenice Reynaud Steffens, à Dr^a. Mariangela Hungria e à Prof^a. Dr^a. Chirlei Glienke pelo auxílio técnico

À Prof^a Dr^a Vanessa Kava Cordeiro e à Dr^a Danyelle Stringari pelo apoio e incentivo no desenvolvimento deste trabalho

À Semília – Genética e Melhoramento, na pessoa do Dr. Francisco Terasawa Junior pelo espaço e materiais cedidos para o desenvolvimento do experimento a campo

Aos funcionários da Semília e às amigas Lisandra Ferreira Maba e Luciana Lange Bassani pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho a campo e de laboratório

A todos os colegas do LabGeM pelo incentivo e auxílio técnico, em especial ao Douglas Adamoski pela incansável colaboração

Ao Departamento de Bioquímica da UFPR, nas pessoas da Prof^a. Dr^a Luíza Araújo e Roseli Prado pelo apoio técnico e científico no desenvolvimento do trabalho

À chefia do Departamento de Psicologia da UNICENTRO e à diretoria do colégio Arthur Ribeiro de Macedo pela compreensão e apoio

Eu escrevo sem esperança de que o que eu escrevo altere qualquer coisa.
Não altera em nada... porque no fundo a gente não está querendo alterar as coisas.
A gente está querendo desabrochar de um modo ou de outro...

Clarice Lispector

RESUMO

A cultura do milho (*Zea mays* L.) tem relevante expressão no cenário mundial e o Estado do Paraná desempenha importante papel como maior produtor de milho no Brasil. Assim, todas as estratégias que permitam otimizar a produção deste importante cultivo são importantes para a pesquisa aplicada. Bactérias endofíticas apresentam alto potencial na elevação dos índices de produtividade, por mecanismos como a fixação biológica do nitrogênio, a promoção do crescimento de plantas pela produção de fitohormônios, o controle de patógenos, entre outros. O presente trabalho tem como objetivos isolar bactérias que se associam endofiticamente com diferentes genótipos de milho (linhagens e híbridos) e caracterizá-las quanto a diversas propriedades morfofisiológicas e genéticas. Para isso, inicialmente foi estabelecida uma coleção de 217 isolados de bactérias endofíticas de raízes de milho e destes, 98 foram mantidos em condições de laboratório. Foram realizadas caracterizações morfofisiológicas, incluindo morfologia de colônias, diversos testes bioquímicos (crescimento em diferentes meios de cultura, redução do nitrato, urease, catalase, tolerância intrínseca a antibióticos) e avaliação da capacidade de fixação do nitrogênio “in vitro”. Como etapa subsequente, avaliou-se o perfil genético das bactérias através da amplificação do DNA com o “primer” BOX-PCR, relacionado a regiões repetitivas e não codificantes do DNA. Foi realizado, ainda, o sequenciamento parcial do gene 16S rDNA de bactérias representantes dos principais agrupamentos obtidos com os dados morfofisiológicos, sendo identificados os gêneros *Pantoea*, *Bacillus*, *Burkholderia* e *Klebsiella*. Constatou-se alta variabilidade entre os isolados obtidos em todos os parâmetros analisados, confirmando que populações com elevado grau de diversidade morfofisiológica e genética se estabelece endofiticamente com o milho. É interessante constatar que essa diversidade ocorre mesmo em linhagens e híbridos de milho obtidos em condições normais de melhoramento para a gramínea, que não consideram a capacidade de associação com bactérias endofíticas. O estabelecimento dessa importante coleção, com microrganismos pertencentes a gêneros pouco estudados com a cultura do milho no Brasil permitirá a condução de estudos para a avaliação da capacidade promotora de crescimento ou de controle biológico dessas bactérias.

Palavras-chave: *Zea mays* L. Bactérias endofíticas. Fixação Biológica de Nitrogênio. BOX-PCR. Gene 16S rDNA.

ABSTRACT

Maize (*Zea mays* L.) has a relevant expression in the world and the State of Parana plays an important role as the largest producer of corn in Brazil. Thus, all strategies to optimize the production of this important crop are important for applied research. Endophytic bacteria have a high potential for raising levels of productivity, by mechanisms such as biological nitrogen fixation, growth promotion of plants by the production of phyto-hormones, the control of pathogens, among others. This work aims to isolate bacteria that are associated with different endophyte genotypes of maize (lineages and hybrid) and characterize them as a number of morphophysiological and genetic properties. So, it was initially established a collection of 217 isolates of endophytic bacteria from roots of maize and 98 isolates maintained at laboratory conditions. Morphophysiological characterizations were performed, including morphology of colonies, various biochemical tests (growth on different culture media, nitrate reduction, urease, catalase, intrinsic tolerance to antibiotics) and assessing the ability of nitrogen fixation in vitro. As next step, it was assessed the genetic profiles of bacteria by amplification of DNA with primer BOX-PCR, related to repetitive regions and non-coding DNA. It was carried out also the partial sequencing of the 16S rRNA gene of representatives of major bacterial groups obtained with the data on physiology, and identified the genera *Pantoea*, *Bacillus*, *Burkholderia* and *Klebsiella*. There was a high variability among the isolates obtained in all parameters, confirming that a population with high morphophysiological and genetic diversity establishes endophytically with corn. It is interesting that this diversity occurs even in lineages and hybrids obtained in normal improvement to the grass, that do not consider the capacity of association with endophytic bacteria. The establishment of this important collection, with micro-organisms from the genera scarcely studied in association with corn crop in Brazil will allow the conduct of studies to evaluate the capacity or growth promoting biological control of these bacteria.

Keywords: *Zea mays* L. Endophytic Bacteria. Biological Nitrogen-Fixing. BOX-PCR. 16S rDNA gene.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|----------|--|----|
| Figura 1 | – SUBUNIDADES DO RIBOSSOMO DE <i>Escherichia coli</i> | 28 |
| Figura 2 | – LOCALIZAÇÃO APROXIMADA DOS “PRIMERS” INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO 16S COM BASE NO GENE DE <i>Escherichia coli</i> | 29 |
| Quadro 1 | – CROQUI DA DISPOSIÇÃO ALEATÓRIA DO PLANTIO DOS GENÓTIPOS (G1, G2, G3, G4, G5, G6 E G7) EM 06 LINHAS E COM 04 REPETIÇÕES DE CADA PLANTA (P1, P2, P3 E P4)..... | 36 |
| Figura 3 | – DISPOSIÇÃO DO PLANTIO EM LINHAS E PLANTAS EM ÉPOCA DE DESBASTE..... | 37 |
| Quadro 2 | – NOMENCLATURA DAS AMOSTRAS DE ACORDO COM A LINHA (L), O GENÓTIPO (G), REPETIÇÃO DA PLANTA (P) DE ONDE FORAM RETIRADAS AS AMOSTRAS E MEIOS DE CULTURA PARA O CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS (N: NFB, J: JNFB, L: LGI E P: LGI-P)..... | 39 |
| Figura 4 | – PLACAS CONTENDO MEIOS SEMI-SELETIVOS E FRAGMENTOS DE RAÍZES PARA ISOLAMENTO DAS COLÔNIAS..... | 40 |
| Figura 5 | – PLACAS CONTENDO COLÔNIAS RISCADAS PARA A PURIFICAÇÃO..... | 40 |
| Quadro 3 | – “PRIMERS” INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO 16S rDNA..... | 48 |
| Tabela 1 | – DADOS ESTATÍSTICOS DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL | 50 |
| Figura 6 | – DIFERENTES PADRÕES MORFOLÓGICOS OBSERVADOS ENTRE 217 COLÔNIAS DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS INDICANDO A PORCENTAGEM DESTES PARÂMETROS..... | 51 |
| Figura 7 | – FOTOMICROGRAFIA ÓPTICA ILUSTRANDO A MORFOLOGIA DAS CÉLULAS BACTERIANAS OBSERVADA PELO TESTE DE COLORAÇÃO DE GRAM..... | 53 |
| Figura 8 | – TESTE DE CATALASE POSITIVO PARA AS AMOSTRAS BACTERIANAS TESTADAS INDICADO PELA FORMAÇÃO DE BOLHAS..... | 53 |
| Figura 9 | – IDENTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE UREASE E DE FERMENTAÇÃO DA GLICOSE EM MEIO EMP..... | 54 |

| | | |
|-------------|---|----|
| Figura 10 – | RESULTADO POSITIVO DO TESTE DE NITRATO OBSERVADO PELA COLORAÇÃO VERMELHA INTENSA COM A ADIÇÃO DAS SOLUÇÕES DO TESTE DE NITRATO EM COLÔNIAS CRESCIDAS..... | 54 |
| Figura 11 – | PLACAS CONTENDO MEIO CALDO DE CARBOIDRATO COM RESULTADO POSITIVO REPRESENTADO PELO CRESCIMENTO DE COLÔNIAS NOS QUADRANTES..... | 55 |
| Figura 12 – | CRESCIMENTO BACTERIANO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ANTIBIÓTICO AMOXICILINA EM PLACAS CONTENDO MEIO NUTRITIVO ÁGAR..... | 56 |
| Figura 13 – | CRESCIMENTO BACTERIANO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ANTIBIÓTICO TETRACICLINA EM PLACAS CONTENDO MEIO NUTRITIVO ÁGAR..... | 56 |
| Figura 14 – | TESTE DE FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO COM FORMAÇÃO DA PELÍCULA MEIO EM SEMI-SÓLIDO NFb LACTATO INDICANDO CRESCIMENTO BACTERIANO..... | 57 |
| Tabela 2 – | PORCENTAGENS DE RESULTADOS POSITIVOS PARA OS TESTES BIOQUÍMICOS..... | 57 |
| Figura 15 – | PERFIL ELETROFORÉTICO DE 17 ISOLADOS BACTERIANOS AMPLIFICADOS POR BOX-PCR..... | 58 |
| Quadro 4 – | IDENTIFICAÇÃO DE 35 ISOLADOS A PARTIR DA SEQUENCIA PARCIAL DO GENE 16S DO rRNA..... | 59 |
| Figura 16 – | GÊNEROS IDENTIFICADOS EM CADA GENÓTIPO POR MEIO DE SEQUENCIAMENTO PARCIAL DA REGIÃO 16S..... | 60 |
| Figura 17 – | DENDROGRAMAS DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E MOLECULAR (BOX-PCR) DE ISOLADOS DO HÍBRIDO 1 (LA x LC)..... | 61 |
| Figura 18 – | DENDROGRAMAS DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E MOLECULAR (BOX-PCR) DE ISOLADOS DO HÍBRIDO 2 (LA x LB)..... | 62 |
| Figura 19 – | DENDROGRAMAS DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E MOLECULAR (BOX-PCR) DE ISOLADOS DO HÍBRIDO 3 (LA x LD)..... | 63 |
| Figura 20 – | DENDROGRAMAS DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E MOLECULAR (BOX-PCR) DE ISOLADOS DA LINHAGEM A..... | 64 |

| | |
|---|----|
| Figura 21 – DENDROGRAMAS DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E MOLECULAR (BOX-PCR) DE ISOLADOS DA LINHAGEM B..... | 65 |
| Figura 22 – DENDROGRAMAS DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E MOLECULAR (BOX-PCR) DE ISOLADOS DA LINHAGEM C..... | 66 |
| Figura 23 – DENDROGRAMAS DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E MOLECULAR (BOX-PCR) DE ISOLADOS DA LINHAGEM D..... | 67 |
| Figura 24 – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS CARACTERIZAÇÕES MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DO GENÓTIPO 1 (HÍBRIDO DE LA x LC)..... | 70 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 2 OBJETIVOS..... | 14 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 14 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 14 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA..... | 15 |
| 3.1 A CULTURA DO MILHO..... | 15 |
| 3.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO EM GRAMÍNEAS..... | 19 |
| 3.3 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS..... | 22 |
| 3.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA..... | 24 |
| 3.5 TÉCNICAS MOLECULARES NA ANÁLISE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS..... | 25 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 30 |
| 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO..... | 30 |
| 4.2 MEIOS DE CULTURA..... | 30 |
| 4.2.1 Meio NFb (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999)..... | 30 |
| 4.2.2 Meio JNFb (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999)..... | 31 |
| 4.2.3 Solução de Micronutrientes (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999)..... | 31 |
| 4.2.4 Meio LGI (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999)..... | 32 |
| 4.2.5 Meio LGI-P (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999)..... | 32 |
| 4.2.6 Solução de Vitaminas (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999)..... | 33 |
| 4.2.7 Meio NFbHP (PEDROSA; YATES, 1984; MACHADO et al., 1991)..... | 33 |
| 4.2.8 Meio Nutriente Ágar (ARAÚJO et al, 2002)..... | 33 |
| 4.2.9 Meio EPM (TOLEDO; FONTES; TRABULSI, 1982)..... | 34 |
| 4.2.10 Meio para Redução de Nitrato (ARAÚJO et al, 2002)..... | 34 |
| 4.2.11 Meio Ágar Uréia (ARAÚJO et al, 2002)..... | 35 |
| 4.2.12 Caldo de Carboidrato (ARAÚJO et al, 2002)..... | 35 |
| 4.3 EXPERIMENTO A CAMPO..... | 35 |
| 4.4 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS..... | 37 |
| 4.5 ARMAZENAMENTO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS..... | 40 |
| 4.6 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DAS COLÔNIAS ISOLADAS..... | 41 |
| 4.6.1 Coloração de Gram..... | 41 |
| 4.6.2 Teste de Catalase..... | 41 |
| 4.6.3 Teste de Urease..... | 42 |
| 4.6.4 Teste de Redução do Nitrato..... | 42 |
| 4.6.5 Teste de Crescimento em Fonte de Carbono..... | 42 |
| 4.6.6 Teste de Tolerância Intrínseca a Antibióticos..... | 42 |
| 4.6.7 Teste de Fixação de Nitrogênio..... | 43 |
| 4.7 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR..... | 43 |
| 4.7.1 Extração de DNA..... | 43 |
| 4.7.2 Caracterização Genética por BOX-PCR..... | 44 |
| 4.7.3 Análise de dados..... | 45 |
| 4.7.4 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA dos isolados..... | 45 |
| 4.7.4.1 Purificação do DNA..... | 46 |
| 4.7.4.2 Reação de Sequenciamento..... | 46 |
| 4.7.4.3 Purificação da Reação de Sequenciamento..... | 47 |
| 4.7.4.4 Edição e Comparação em banco de dados..... | 47 |
| 5 RESULTADOS..... | 49 |
| 5.1 ESTABELECIMENTO DA COLEÇÃO DE ISOLADOS BACTERIANOS..... | 49 |
| 5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL..... | 49 |
| 5.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA..... | 50 |
| 5.3.1 Morfologia das colônias..... | 50 |
| 5.3.2 Testes Bioquímicos..... | 52 |
| 5.4 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA..... | 58 |
| 5.4.1 BOX-PCR..... | 58 |
| 5.4.2 Sequenciamento..... | 58 |
| 5.5 ANÁLISE DE DADOS..... | 60 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 68 |
| 7 CONCLUSÃO..... | 76 |
| 8 PERSPECTIVAS..... | 77 |

1 INTRODUÇÃO

Associações vantajosas que acontecem entre raízes de gramíneas e bactérias presentes no solo incluem grupos fixadores de nitrogênio e/ou promotores de crescimento. A cultura do milho (*Zea mays* L.) representa, grande potencial de exploração destas associações, podendo trazer benefícios como o incremento na produtividade (BOBATO, 2006; DIDONET, 2007).

De acordo com dados da Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB (2009), o Brasil é o terceiro maior produtor de milho no cenário mundial, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e da China. Em nível nacional, a produtividade média é baixa, em torno de 3.175 kg por hectare. Com cultivo em praticamente todo território, 90% da produção concentra-se nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste com 43%, 25% e 22%, respectivamente. O Paraná ocupa posição de destaque entre os estados produtores, por ser o maior produtor nacional.

Na safra 2007-08 a produtividade média do Estado foi a maior já colhida (PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2009). A sustentabilidade da produção é assegurada pelo aumento da produção de aves, suínos e bovinos, além de melhores condições de transporte.

Para que o máximo rendimento da cultura seja conseguido, geralmente é utilizada grande quantidade de fertilizantes nitrogenados, implicando em alto custo de produção. Assim, a caracterização de bactérias fixadoras de nitrogênio em associação com o milho contribui para o enriquecimento de um banco de dados sobre esses organismos, gerando maior conhecimento sobre o possível manejo da produção, podendo contribuir para a diminuição no uso de fertilizantes nitrogenados, bem como permitindo a seleção de genótipos mais produtivos (ROESCH *et al.*, 2005).

Demonstrando a eficiência de bactérias diazotróficas em associação com gramíneas, Cavallet *et al.* (2000) propõem o uso de um produto comercial à base de *Azospirillum* spp para aumentar a produtividade de grãos de milho, sendo que a inoculação do produto aumentou o comprimento médio das espigas, sem alterar a altura da planta nem número de fileiras de grãos por espiga. Além da fixação biológica do nitrogênio (FBN), este grupo pode estar contribuindo também no aumento da superfície de absorção das raízes da planta, dada a sua condição de

endofitismo. Outros gêneros endofíticos das raízes de milho podem também estar modificando a morfologia do sistema radicular e o diâmetro médio das raízes devido à produção de substâncias promotoras de crescimento como auxinas, giberilinas e citocinas.

É importante lembrar que o uso de protocolos moleculares tem sido extensivamente aplicado em quase todos os ramos da microbiologia. O isolamento do DNA bacteriano deve ser simples, rápido, reprodutível e de baixo custo, especialmente quando a análise de muitas espécies e linhagens é necessária (NOGUEIRA *et al.*, 2004). Desta forma, técnicas como PCR (“Polymerase Chain Reaction”) utilizando “primers” específicos como BOX-PCR e sequenciamento de regiões conservadas do DNA de bactérias, contribuem para a identificação de grupos de bactérias envolvidas na promoção de crescimento vegetal. O conhecimento e a caracterização destas bactérias fornecem subsídios para o enriquecimento das informações de sua interação com diferentes genótipos do milho, contribuindo assim como uma estratégia que beneficia tanto o manejo quanto a produção da cultura.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter uma coleção de bactérias endofíticas isoladas de raízes de diferentes genótipos de milho e caracterizar por caracteres morfofisiológicos e genéticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer uma coleção de isolados de bactérias endofíticas de raízes de milho a serem depositadas em banco genético do Laboratório de Genética de Microrganismos da UFPR;
- Caracterizar morfofisiologicamente os isolados obtidos pela determinação de vários caracteres morfológicos e bioquímicos, incluindo a avaliação da capacidade de fixação de nitrogênio “in vitro”;
- Caracterizar geneticamente os isolados obtidos, por meio da técnica de BOX-PCR;
- Avaliar o grau de diversidades fenética e genética entre os isolados;
- Identificar isolados de bactérias endofíticas obtidos por sequenciamento parcial do DNA codificante do gene 16S RNAr.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A CULTURA DO MILHO

Uma das mais importantes plantas comerciais, o milho (*Zea mays* L.), pertence à família Gramineae e é originário das Américas, possivelmente do México, na América Central ou do Sudoeste dos Estados Unidos. Devido à sua versatilidade, é utilizado tanto para o consumo humano, quanto para animal e também, em aplicações industriais. Atualmente apresenta enorme importância econômica, aliada a alguns fatores que contribuem para o aumento da produtividade no Brasil. Eles compreendem a adaptação de cultivares a vários tipos de clima e solo, o melhoramento genético e a melhoria de propriedades químicas, físicas e biológicas dos solos cultivados (BOBATO, 2006).

A produção do milho no Brasil é dividida em duas épocas de plantio, sendo que os plantios de verão caracterizam a primeira safra, ocorrendo em período chuvoso e a segunda safra, que é plantada quase sempre após a soja precoce. Com a popularidade da soja no mercado internacional, o milho acabou perdendo áreas de cultivo de verão, levando ao aumento do cultivo na segunda safra e elevando significativamente a produção no inverno. Esta segunda safra, também conhecida como safrinha, mantém a média de área de cultivo de milho entre 12 a 13 milhões de hectares (DUARTE, 2007). Ela acabou sendo uma opção de substituição da cultura do trigo (de inverno) após a soja, somente em regiões quentes. Inicialmente, ela começou como um cultivo marginal feito pelos agricultores, tornando-se atualmente um cultivo maior que o da 1ª safra. Há programas de melhoramento específicos para a recomendação de variedades destinadas à safrinha (TERASAWA JUNIOR, 2006).

Segundo o levantamento feito pela CONAB (2009), com relação à safra de 2008/2009 a produtividade do milho no Brasil chegou a 3.630 kg/ha na 1ª safra e 3.540 kg/ha na safrinha. Só no Estado do Paraná, para o mesmo período, a produtividade foi de 5.140 kg/ha e 3.024 kg/ha para a 1ª e 2ª safras respectivamente. Foi constatada redução de 27,2% na safra 2008/2009 que atingiu 6,5 milhões de toneladas. O fator preponderante para esta perda foi a estiagem

ocorrida nos meses de novembro e dezembro no Paraná, Rio Grande do Sul, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. De acordo com a pesquisa realizada pelo Departamento de Economia Rural (Deral) em dezembro de 2009, a primeira safra do milho no Paraná indica que 95% das lavouras estão se desenvolvendo bem e a colheita está prevista em 6,44 milhões de toneladas. Houve uma redução de 28% da área total de plantio em 2009-2010, o que cobre 913 mil hectares no Paraná com produção indicando uma estabilidade devido às boas produtividades esperadas (CIMILHO, 2009).

Um aspecto importante da produtividade no milho é resultante da interação entre genótipos e ambientes ($G \times E$). Esta interação é consequência do comportamento diferenciado de materiais genéticos frente a condições ambientais distintas. O ambiente apresenta forte influência, em especial sobre os caracteres quantitativos, sendo descritos dois tipos de interação ($G \times E$): de natureza simples ou complexa. Interações complexas apresentam real importância ao melhoramento, interferindo na eficiência da seleção e na precisão das recomendações de cultivo (TERASAWA JUNIOR, 2006).

Segundo Ritchie, Hanway e Benson (1993), nos estádios iniciais de desenvolvimento da cultura, o sistema radicular das plantas de milho é pouco desenvolvido e, portanto, a exploração do solo é baixa. Assim, altos níveis de N próximos ao sistema radicular são necessários para se atender à demanda da cultura. É nesta fase que ocorre a diferenciação das partes da planta. Posteriormente ocorre absorção de N proporcional ao aumento de crescimento até atingir seu máximo entre o início do florescimento e o início do enchimento de grãos.

Vários fatores como altitude, relevo, regime pluviométrico, tipos de solos, épocas de semeadura, técnicas de manejo e sistemas de rotação de culturas, contribuem para grande diversidade ambiental do milho. Como se trata de uma gramínea com metabolismo de fixação de carbono via C4, alguns fatores ambientais são considerados especialmente importantes, destacando-se: a temperatura, o fotoperíodo e a disponibilidade de água e de nutrientes. Os estresses bióticos, como pragas e doenças, também devem ser levados em consideração (TERASAWA JUNIOR, 2006).

A deficiência de nitrogênio (N) é o segundo fator que mais limita a produtividade de biomassa em ecossistemas naturais e agrícolas. Então, a prática da adubação nitrogenada em culturas anuais e forrageiras pode prover N às plantas

em quantidade suficiente para que atinjam seu potencial de crescimento. O excesso de N pode trazer consequências indesejáveis dos pontos de vista agrônomo, ambiental e econômico (BOBATO, 2006).

Nas últimas décadas grande parte do N fornecido a plantações de milho é proveniente de adubos sintéticos, o que gera preocupação com relação à poluição de águas e do próprio solo. A quantidade de N aplicado na cultura do milho tem apresentado um significativo aumento, devido principalmente ao melhoramento genético das cultivares de milho que se tornaram mais exigentes, requerendo maiores quantidades de N para altas produtividades (MATSON; NAYLOR; MONASTEIRO, 1998).

Do ponto de vista econômico e ambiental, a decisão sobre a necessidade de adubação nitrogenada deve levar em consideração alguns fatores para uma recomendação mais segura, tais como: condições edafoclimáticas (relativas à influência dos solos nos seres vivos), sistema de cultivo (plantio direto ou convencional), época de semeadura, responsividade do material genético, rotação de culturas, época e modo de aplicação, fontes de N, aspectos econômicos e operacionais (BOBATO, 2006).

De modo geral, a recomendação da adubação nitrogenada em cobertura para a cultura do milho varia de 40 a 80 kg de N/ha. Com o uso de alta tecnologia, doses de nitrogênio variando de 100 a 150 kg/ha podem ser necessárias para a obtenção de elevadas produtividades (EMBRAPA, 2008). Para adubação com uréia e adubo contendo apenas nitrogênio e fósforo, a média da região sul de custo para o cultivo de milho chega a R\$ 700,00 por hectare (PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2008).

O inoculante é caracterizado como o material que contém microrganismos que atuam favoravelmente no desenvolvimento das plantas, composto por bactérias específicas para cada espécie vegetal. Sendo assim, a utilização destes produtos atua de maneira a aumentar a produtividade de determinada cultura, além de melhorar a qualidade dos solos, reduzir os custos e a quantidade de adubos nitrogenados com vistas à preservação ambiental (EMBRAPA, 2007).

Trabalhos com inoculantes produzidos a partir de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio buscam avaliar a contribuição dessas bactérias na eficiência de crescimento vegetal e ganho de produtividade visando a diminuição do impacto ambiental que a adubação nitrogenada acarreta, além da redução de custos de produção. Campos, Theisen e Gnatta (2000) buscaram identificar a eficiência de um

inoculante produzido a partir de uma estirpe de *Azospirillum* sp aplicado em cultura de milho. Os autores observaram que o produto testado não apresentou resultado positivo para o número de plantas, de espigas e estatura das plantas, nem resposta para o rendimento de grãos. Eles atribuem os resultados à escolha da estirpe que não foi suficientemente eficiente e destacam a necessidade de se buscar e testar estirpes adaptadas a cada região em termos de clima, sistema de manejo e cultivares.

De acordo com Hungria (2009), o primeiro inoculante comercial para milho e trigo foi desenvolvido pela Embrapa Soja e pela Universidade Federal do Paraná em parceria com a iniciativa privada. O produto é comercializado a R\$10,00 a dose/hectare e a inoculação é feita pela aplicação do produto sólido ou líquido nas sementes e como o inoculante carrega microrganismos vivos, é preciso monitorar aspectos para sua manutenção, tais como: temperatura, não exposição direta ao sol, não aplicação conjunta com agrotóxicos. Os trabalhos que levaram ao desenvolvimento do inoculante foram realizados com seis estirpes de *Azospirillum brasiliense* e mostraram incremento médio de 25% a 30% no rendimento do milho, o que significa uma economia em torno de U\$1 bilhão por safra, considerando uma área cultivada de 13 milhões de ha com rendimento médio de 3.200 kg/ha. Além de realizar fixação biológica do nitrogênio, esta bactéria promove o crescimento das plantas pela produção de hormônios que resultam em crescimento radicular e consequentemente, uma maior absorção de água e nutrientes.

Segundo Duarte (2007), mesmo pelo fato do Brasil não ter tradição de exportar e importar milho em grãos, seu potencial foi reconhecido no mercado externo em 2001 quando a participação do país aumentou de 0,01% para 8%. No ano seguinte, o índice de exportação e importação de grãos de milho atingiu 2% em decorrência da diminuição de oferta do milho e crescente produção de soja. Esses valores representaram uma resposta à grande safra colhida em 2001, que fez com que os produtores buscassem opções para o escoamento da produção, além da interferência de fatores como a alta cotação do milho e a proibição do milho transgênico que atraiu compradores exigentes quanto às leis de uso desses produtos.

O milho é matéria-prima para produção de uma centena de produtos, por exemplo, o ramo de suínos e aves consome aproximadamente 70% do milho

produzido no mundo e entre 70 e 80% do milho produzido no Brasil (EMBRAPA, 2009). O milho para consumo humano pode ser industrializado pelo processo de moagem úmida e seca, ou consumido quando os grãos estão em estado leitoso, ou seja, milho verde. Do processo de moagem seca resultam subprodutos como farinha de milho, fubá, quirera, óleo etc. Já do processo de moagem úmida, o principal subproduto é o amido (CRUZ, 2007).

3.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO EM GRAMÍNEAS

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é realizada por bactérias diazotróficas que possuem o complexo enzimático da nitrogenase, capaz de catalisar a fixação do nitrogênio atmosférico (DÖBEREINER *et al.*, 1993 *apud* DIDONET, 2007). Entre estas várias bactérias, destacam-se espécies de *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiela*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Paenibacillus*, *Acetobacter* e a família *Rhizobiaceae*. A maioria tem sido observada em associação com plantas de arroz, milho, sorgo, trigo, soja, feijão, tomate, algodão e cana-de-açúcar (DI CELLO *et al.*, 1997; BURDMAN; KIGEL; OKON, 1997; BALDANI *et al.*, 1997; REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998; HALLMANN *et al.*, 1997; BALDANI *et al.*, 2000), sendo que alguns desses microrganismos são testados quanto à capacidade de produção de vitaminas e fitormônios (PEDROSA *et al.*, 2000).

Há estudos de associação assimbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio e raízes de milho com resultados promissores. O trabalho de Raju, Evans e Seider (1972) traz algumas considerações preliminares sobre pesquisas focadas na FBN, considerando plantas não leguminosas. No trabalho, são discutidos aspectos da atividade microbiológica na rizosfera de várias espécies de plantas, buscando evidências da atividade de fixação de nitrogênio, ainda desconhecida na época.

No Brasil, os estudos sobre a FBN em leguminosas iniciaram-se nos anos 1950 e com a utilização de inoculantes *Bradyrhizobium* na cultura de soja, o país se tornou competitivo no mercado mundial de soja. Bactérias do gênero *Bradyrhizobium* em contato com as raízes de soja, penetram através dos pelos radiculares e formam nódulos. Dentro deles, as bactérias contendo a enzima nitrogenase, conseguem reduzir o nitrogênio atmosférico à amônia. Assim, as

bactérias distribuem os íons transformados para que a planta de soja possa incorporá-los em forma de nitrogênio orgânico (BÁRBARO; BRANCALIÃO; TICELLI, 2008).

As bactérias diazotróficas associam-se às plantas podendo promover aumento na produtividade ou até mesmo no vigor e na resistência aos estresses bióticos e abióticos. Estas bactérias podem colonizar partes internas dos tecidos vegetais, sendo consideradas endofíticas ou estarem apenas no ambiente externo das raízes (rizosfera), denominadas então epifíticas (BALDANI *et al.*, 1997; REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998). Os microrganismos endofíticos podem ser simbióticos ou associativos. Os simbióticos compreendem a família *Rhizobiaceae* que altera a raiz da planta formando um nódulo. Já os associativos, que em geral não provocam alterações visíveis, incluem os gêneros *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum* e outros (DIDONET, 2007).

Perin, Baldani e Reis (2004) relataram que além de fixar nitrogênio atmosférico, a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* produz hormônios de crescimento, como ácido indol acético (AIA) e é tolerante a antibióticos, como estreptomicina, tetraciclina, rifampicina, ampicilina, erytromicina e roxitromicina e possui atividade antagonista a *Xanthomonas albilineans* e ao fungo *Colletotrichum falcatum*. Os autores avaliaram a diversidade da população de *G. diazotrophicus* originária de cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) de diferentes regiões e bancos de germoplasma. Através da reação imunológica mediada pela técnica de ELISA indireta, os autores encontraram dois grandes grupos de isolados não havendo relação com a espécie da planta. Os autores relataram ainda que altas doses de nitrogênio levam à diminuição da diversidade de *G. diazotrophicus*.

Mehnaz, Weselowski e Lazarovitz (2006), realizaram estudos de identificação de bactérias residentes na rizosfera de milho crescido no Sudeste de Ontário (Canadá), isolando linhagens do solo aderidas às raízes do milho. Algumas apresentaram atividade de fixação de nitrogênio e produziram ácido acético. Os isolados foram comparados com três espécies do gênero *Gluconacetobacter* através de testes bioquímicos e moleculares. Os resultados mostraram a necessidade de uma remodelação na classificação das bactérias desse grupo e contribuíram com a primeira descrição da *G. azotocaptans*, pertencente à família Acetobacteraceae.

Ueda *et al.* (1995) realizaram um trabalho com genótipos de arroz, cultivados em condições inundadas e mostraram que a FBN contribui para obtenção do

nitrogênio necessário ao seu desenvolvimento. Várias bactérias diazotróficas endofíticas, representantes dos gêneros *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Burkholderia* e *Herbaspirillum*, foram identificadas em associação com variedades de arroz. Estudos moleculares, utilizando como marcador o gene *nifH*, mostraram a ocorrência de oito novos tipos de bactérias diazotróficas presentes no interior ou na rizosfera do arroz.

A diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas, em diferentes genótipos de arroz, varia nos estágios de desenvolvimento e partes da planta, sendo que possivelmente o colmo é um nicho mais sustentável para endofíticas fixadoras, do que a raiz. Trabalhos com diversidade de estirpes de *Azoarcus* mostraram que em espécies de arroz selvagem, a diversidade era menor do que em variedades geneticamente melhoradas. Isso sugere que a avaliação da diversidade de bactérias diazotróficas presentes nos tecidos, nos diferentes estágios de desenvolvimento da planta, pode ajudar a compreender o papel desses microrganismos em seu habitat natural (RODRIGUES *et al.*, 2006).

A produtividade da maioria das plantas é garantida pela grande utilização de fertilizantes nitrogenados, que além de aumentar os custos de produção, podem oferecer riscos de contaminação ambiental. A aplicação de elevadas quantidades de nitrogênio durante o desenvolvimento dos cultivares híbridos, pode levar à seleção de genótipos que necessitam de altos níveis desse nutriente, enquanto que, as baixas concentrações de N podem contribuir para seleção de genótipos eficientes na FBN, o que representa diminuição na necessidade da fertilização nitrogenada (ROESH *et al.*, 2005).

No cultivo de milho, o rendimento é resultado da combinação de fatores como potencial genético da semente, condições climáticas, local de semeadura e manejo da lavoura. Portanto, para otimizar o rendimento são necessárias grandes quantidades de fertilizantes, incluindo os nitrogenados. As gramíneas são amplamente utilizadas pelo homem na alimentação e assim, a economia de adubos nitrogenados com a utilização de bactérias fixadoras, seria de grande valor comparado às leguminosas (BÁRBARO; BRANCALÃO; TICELLI, 2008).

Roesh *et al.* (2005) desenvolveram um trabalho cujo objetivo foi identificar diferentes cultivares de milho eficientes na absorção de nitrogênio e na associação com bactérias diazotróficas. Concluíram que a elevada ocorrência de população dessas bactérias e a baixa resposta à adubação nitrogenada com acúmulo de N sob

condições de baixa fertilidade, possibilitou a seleção de um cultivar promissor para o cultivo em solos de baixa disponibilidade de nitrogênio.

Desde o isolamento de *Beijerinckia fluminense* da rizosfera de cana-de-açúcar (DÖBEREINER; RUSCHEL, 1958) e com a reidentificação de *Azospirillum lipoferum* isolado de raízes de diversas gramíneas (DÖBEREINER; DAY, 1976), novas espécies de bactérias diazotróficas têm sido isoladas de raízes e partes aéreas de gramíneas, cafeeiros, bananeiras, abacaxizeiros, plantas como batata-doce e mandioca. Bactérias do gênero *Azospirillum* também foram observadas na rizosfera de outras fruteiras (WEBER; BALDANI; DÖBEREINER, 2000).

Estudos sobre bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico microaeróbias do gênero *Azospirillum*, que quando associadas à rizosfera da planta contribuem para sua nutrição, apresentam perspectivas de manejo da associação *Azospirillum* spp. e milho, com previsão de aumento de produtividade e diminuição de custos de produção (BODDEY; DÖBEREINER, 1995; OKON; VANDERLEYDEN, 1997).

3.3 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

A partir de estudos em tecidos internos de plantas saudáveis, foi desenvolvida a ideia de que bactérias não patogênicas que habitam tecidos da planta são endofíticas. Os relatos preliminares as consideravam como contaminantes resultantes da desinfestação superficial ou patógenos fracamente virulentos. Entretanto, há indícios de que bactérias endofíticas possam estar influenciando o crescimento vegetal e reduzindo sintomas de fitopatologias (HALLMANN *et al.*, 1997).

O trabalho de Barreti, Souza e Pozza (2008) é um exemplo de avaliação do efeito de bactérias endofíticas para a promoção de crescimento. Endofíticos isolados de folhas e caule do tomateiro foram introduzidos em plantas que tiveram o crescimento aumentado em altura, área foliar, número de folhas e peso da matéria fresca e seca. Ainda foi observado um aumento significativo dessas características em plantas com inoculação de isolados endofíticos, o que representa um papel importante dessas bactérias na promoção do crescimento vegetal.

Assumpção *et al.* (2009) relataram que há uma grande comunidade bacteriana endofítica cultivável em sementes de soja, sendo que muitos desses isolados são capazes de sintetizar ácido indolacético, solubilizar fosfato e inibir o crescimento e esporulação de fungos fitopatogênicos, mas são incapazes de promover crescimento de plantas de soja.

Lacava *et al.* (2006) caracterizaram por métodos moleculares a comunidade bacteriana endofítica de plantas de citros assintomáticas e afetadas pela clorose variegada do citros. Eles observaram que o desenvolvimento da doença pode ser resultado da alteração de colonização bacteriana endofítica que provoca interação ativa com outros microrganismos.

Segundo Cavallet *et al.* (2000), o efeito da bactéria *Azospirillum* sp. tem sido pesquisado quanto ao rendimento no milho. Pesquisas com experimentos de inoculação a campo revelaram que o gênero *Azospirillum* sp., além da fixação biológica do nitrogênio, promove ganhos em rendimento e no aumento da superfície de absorção das raízes da planta. Isso ocorre porque a inoculação modifica a morfologia do sistema radicular, alterando o número de radículas e o diâmetro médio das raízes laterais e adventícias.

A produção de substâncias reguladoras de crescimento de plantas tem sido observada também em bactérias como as dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia*. Isto pode ser ilustrado pelo trabalho de Weber, Baldani e Döbereiner (2000) no qual foi demonstrada pela primeira vez a contribuição de bactérias diazotróficas no crescimento de bananeira.

A bactéria endofítica *Pantoea agglomerans* pode estar relacionada à promoção de crescimento vegetal e à proteção das sementes contra doenças (FERREIRA *et al.*, 2008). Efeito antagonista foi observado em isolados de *Burkholderia cepacia* que podem reduzir o crescimento de fungos fitopatogênicos em meio artificial o que possivelmente também contribui para o crescimento vegetal (BEVIVINO *et al.*, 1994). Da mesma forma, o trabalho de Procópio *et al.* (2009) investigou a ação entre bactérias endofíticas isoladas de eucalipto com a promoção do crescimento vegetal e inibição de fungos endofíticos.

Na cultura do milho, existem diversos estudos de associações com bactérias fixadoras de nitrogênio. Mesmo não formando nódulos, auxiliam na assimilação do nitrogênio atmosférico por processos de colonização da superfície e/ou interior das raízes. Isso ressalta a importância da seleção de estirpes adaptadas às condições

de cultivo para possíveis recomendações com fins comerciais (BODDEY; DÖBEREINER, 1995; BALDANI *et al.*, 1997; REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998; ROESH *et al.*, 2005; DIDONET, 2007).

3.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA

A determinação das atividades metabólicas das bactérias “in vitro” pode ser chamada de provas bioquímicas que servem para auxiliar na identificação de grupos ou espécies de bactérias. As provas bioquímicas auxiliam no processo de caracterização, visto que cada microrganismo pode apresentar um sistema enzimático específico (UFBA, 2008b).

A enzima catalase catalisa a reação sobre o peróxido de hidrogênio e produz oxigênio e água. O peróxido de hidrogênio representa um forte oxidante presente em grande parte dos organismos e promove a degradação de compostos poluentes em pouco tempo representa, portanto, uma forma de proteção para os organismos (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000).

Segundo Cassini (2005) a enzima urease hidrolisa a uréia em duas moléculas de amônia e uma de anidrido carbônico. A amonificação, ou seja, o processo de liberação de amônia de compostos orgânicos nitrogenados usados como fonte de carbono e nitrogênio por vários microrganismos é uma etapa do ciclo do nitrogênio que disponibiliza este elemento às plantas.

O processo de desnitrificação consiste na redução microbiana de nitrito e nitrato, com a liberação de nitrogênio molecular, óxido nitroso e algumas vezes óxido nítrico. A enzima responsável pelo processo de desnitrificação é a nitrato redutase, e ela só é ativa quando o suprimento de oxigênio é insuficiente para satisfazer a demanda biológica (CASSINI, 2005).

A evidência da fixação biológica de nitrogênio realizada por bactérias pode ser feita a partir de meios semi-sólidos, visto que a concentração do meio é reduzida em torno de dez vezes comparando com o meio sólido. Esses meios permitem que a bactéria inoculada comece a se multiplicar em condições ótimas de fixação de nitrogênio, ou seja, baixas tensões de oxigênio que permitam a divisão celular dos microrganismos aeróbicos sem inibir a atividade da nitrogenase. A formação de uma

película superficial indica a presença microrganismos fixadores de nitrogênio (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995; REIS; BALDANI; BALDANI, 2002 *apud* DIDONET, 2007). A transformação do nitrogênio atmosférico em amônia é proporcional à redução de acetileno em etileno, uma vez que a nitrogenase tem função inespecífica. Portanto, a medição de redução de acetileno indica a atividade da nitrogenase dos isolados testados.

A metodologia convencional para o processo de isolamento de bactérias e caracterização de microrganismos diazotróficos consistia de provas bioquímicas, crescimento em meio seletivo e testes sorológicos como aglutinação, imunodifusão e ELISA (TARRAND; KRIEG; DÖBEREINER, 1976).

O trabalho de Rezende, Oliveira e Didonet (2009) é um exemplo de utilização de critérios morfológicos da colônia e de testes bioquímicos para isolar bactérias diazotróficas do gênero *Pseudomonas* associadas a plantas de arroz. Os tradicionais testes bioquímicos passaram a ser utilizados como uma ferramenta auxiliar na classificação taxonômica de bactérias. A capacidade de utilização de várias fontes de carbono, a presença de determinadas enzimas e a utilização intrínseca de antibióticos são alguns dos parâmetros avaliados para a descrição de novas espécies ou gêneros, sendo instrumentos auxiliares à taxonomia molecular (SCHLOTTER *et al.*, 2000).

3.5 TÉCNICAS MOLECULARES NA ANÁLISE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

Estudos de colonização de bactérias diazotróficas enfocam processos de reconhecimento planta-bactéria e requerem o conhecimento do ambiente de estudo. Para se quantificar a população alvo de um dado hábitat podem ser utilizados métodos imunológicos, nos quais é necessária a caracterização do anticorpo que será usado como sonda (REIS; OLIVARES; CRUZ, 1997).

Um estudo com pasto do gênero *Brachiaria*, ressalta que como a diversidade de microrganismos do solo e daqueles encontrados no interior de plantas está condicionada à vegetação, diferentes genótipos da planta podem exercer efeito seletivo sobre a população de microrganismos, o que pode resultar em diferentes respostas quanto à contribuição da FBN obtida. Neste trabalho, foram utilizadas

técnicas de ELISA – “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” e BIOLOG para estudar a diversidade intra-específica de *Azospirillum amazonense* isolados de raízes de *Brachiaria* e verificar possíveis efeitos de genótipo da planta e dos locais de coleta sobre a diversidade (REIS JUNIOR; TEIXEIRA; REIS, 2003).

O uso de protocolos moleculares é extensivamente aplicado em muitos ramos da microbiologia. Uma de suas etapas principais é o isolamento do DNA bacteriano, que deve ser simples, rápido, reprodutível e de baixo custo, especialmente quando a análise de muitas espécies e linhagens é necessária. A possibilidade da análise direta da molécula de DNA sem a interferência ambiental faz com que as técnicas moleculares sejam muito utilizadas em métodos de caracterização de gêneros, espécies, variedades e linhagens específicas ou cultivares de diferentes organismos. Porém, é preciso conhecer a sequência nucleotídica que flanqueia a região a ser amplificada, além de cuidados especiais para evitar a contaminação por DNA exógeno. A reação de polimerase em cadeia (PCR – “Polymerase Chain Reaction”) é uma técnica molecular que a partir da extração do DNA, possibilita amplificação de sequências de interesse utilizando tanto “primers” específicos como ao acaso e “primers” de regiões conservadas do DNA. Essa técnica foi desenvolvida na década de 80 por Kary Mullis e a partir dela, mudou-se a forma de análise do DNA em função da produção de múltiplas cópias de sequências específicas, sem a necessidade da técnica de clonagem (ALBERTS *et al.*, 2004).

O trabalho de Pereira *et al.* (2007), utilizou a técnica de PCR com o “primer” BOX, que amplifica regiões conservadas e repetitivas do DNA cromossômico, em geral no espaço intergênico, para detectar a diversidade genética de estirpes de bactérias do tipo rizóbios de soja. Fernandes, Souza e Campanharo (2009) utilizaram o método de BOX-PCR para indicar a diversidade genética entre isolados bacterianos rizosféricos de plantas de milho e ressaltam que a técnica de BOX-PCR é uma metodologia eficiente, rápida e de baixo custo para caracterização dessas estirpes.

Kim *et al.* (2001) usaram o marcador genômico BOX-PCR e VNTR (“Variable Number Tandem Repeats”) para estabelecer relações genéticas entre o agente etiológico do antrax, *Bacillus anthracis* e espécies relativamente próximas. Neste estudo, foi estabelecida uma forte correlação entre a análise VNTR e BOX-PCR, sugerindo que essas abordagens são eficientes para determinar relações genéticas e diversidade entre *B. anthracis* e espécies próximas.

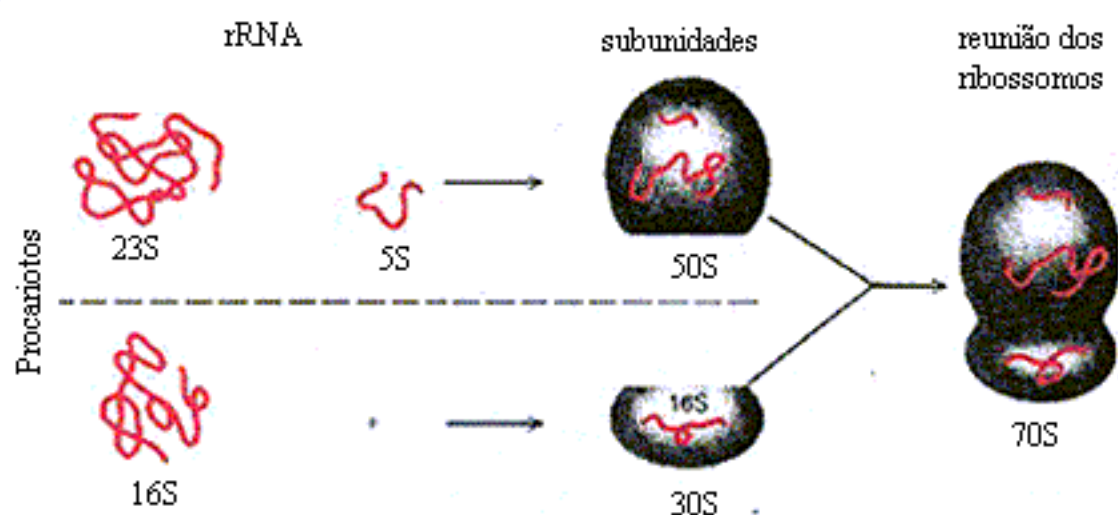
Até 1975, a idéia de sequenciamento de cromossomos inteiros, parecia improvável. Hoje, inúmeras sequências completas de muitas espécies já são conhecidas e registradas em bancos genéticos. A descoberta das enzimas de restrição, da clonagem gênica, da técnica de PCR e o aprimoramento dos processos de eletroforese, com máquinas automatizadas de sequenciamento, permitiram as análises de DNA em larga escala (SNUSTAD; SIMMONS, 2008).

A base dos critérios de agrupamento e de classificação taxonômica passou de apenas classificação morfológica para critérios moleculares em análises filogenéticas. Sequências de nucleotídeos altamente conservadas em bactérias têm sido o fundamento para a revisão das inter-relações entre espécies, gêneros ou até mesmo famílias (OLSEN; WOESE; OVERBEEK, 1994).

O uso da sequência de nucleotídeos do gene que codifica o 16S rRNA (subunidade menor do ribossomo) foi estabelecido como método padrão de análise para bactérias. Os genes que codificam para RNAs ribossômicos são essenciais para a sobrevivência de todos os organismos, uma vez que ocorre nas organelas responsáveis pela síntese protéica. A sequência destes genes corresponde a regiões altamente conservadas (AMANN; LUDWIG; ACHLEIFER, 1995). Desta forma, estudos têm utilizado o sequenciamento total ou parcial dos genes (16S rRNA e 23S rRNA), bem como regiões intergênicas (IGS) para estudos de filogenia (GURTLE; STANISH, 1996). Os ribossomos são estruturas pequenas, com cerca de 20 a 30 nm de diâmetro, consistindo de duas subunidades de tamanhos desiguais, referentes às subunidades maior e menor. Uma subunidade é composta por um complexo formado por moléculas de RNA e proteínas, cada molécula contém pelo menos uma subunidade de RNA ribossômico e uma grande quantidade de proteínas ribossomais. O ribossomo procarioto em *Escherichia coli* tem um tamanho de 70S e aproximadamente dois terços dele consiste de rRNA e o restante de proteínas ribossômicas. Assim, as subunidades 50S (contém o rRNA 16S) e 30S (contém os rRNAs 5S e 23S) combinadas originam a estrutura 70S (FIGURA 1) (UFMG, 2010).

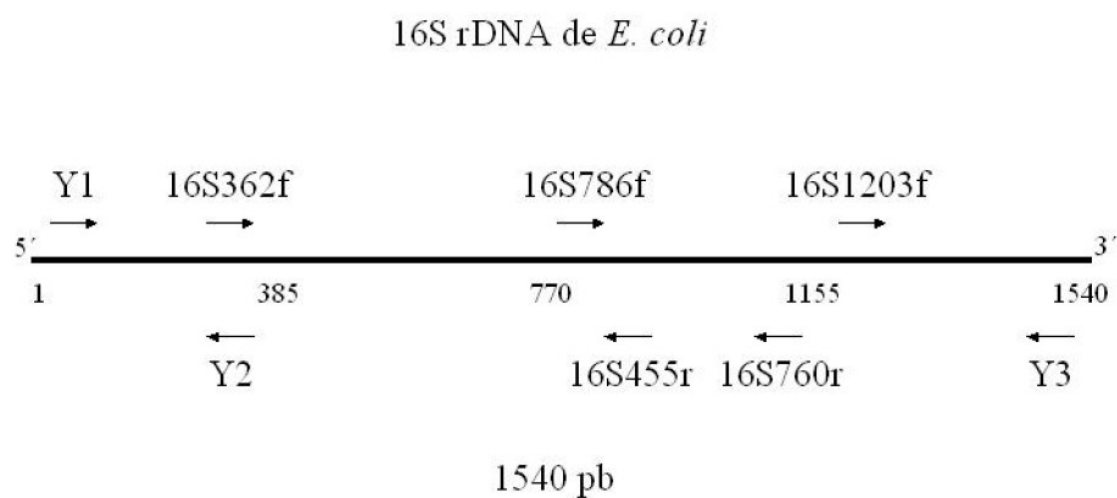
O sequenciamento da região do DNA que codifica o gene 16S rRNA é uma ferramenta importante para determinar a posição taxonômica de estirpes de bactérias, como por exemplo, no trabalho de Chueire *et al.* (2003) onde o sequenciamento dessa região procurou estabelecer relações filogenéticas de estirpes comerciais recomendadas para as culturas de soja e do feijoeiro no Brasil.

O trabalho destaca a dificuldade de separação das espécies do gênero *Bradyrhizobium* devido à pouca variabilidade genética, assim, o sequenciamento da região do DNA codificadora do gene 16S rRNA foi essencial para permitir a junção de estirpes comerciais em dois agrupamentos distintos: com a espécie *B. elkanii* e com a espécie *B. japonicum*. O sequenciamento do gene 16S rRNA torna-se uma ferramenta útil para o estabelecimento da diversidade de rizóbio no Brasil e reconhecimento de cada uma das estirpes comerciais, atividade fundamental para o controle dos inoculantes que devem carregar exclusivamente essas estirpes selecionadas. A FIGURA 2 mostra a localização aproximada dos “primers” usados na amplificação e sequenciamento da região 16S codificadora do rRNA.



Fonte: <http://www.icb.ufmg.br/prodabi/grupo6/estrutura.html>

FIGURA 1 – SUBUNIDADES DO RIBOSSOMO DE *Escherichia coli*



Fonte: <http://www.psb.ugent.be/rrna/primers/bs/HTML>

FIGURA 2 – LOCALIZAÇÃO APROXIMADA DOS “PRIMERS” INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO 16S COM BASE NO GENE DE *Escherichia coli*

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram utilizados os seguintes genótipos de milho (*Zea mays* L.): quatro linhagens (LA, LB, LC e LD) e três híbridos comerciais (H1, H2 e H3 provenientes dos cruzamentos entre LA x LC, LA x LB e LA x LD respectivamente) e uma coleção de bactérias endofíticas isoladas de fragmentos radiculares em trabalho realizado no LABGEM (Laboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Genética, UFPR). Os cultivares foram fornecidos pela Empresa Semília Genética e Melhoramento Ltda situada em Bateias, Campo Largo – Paraná.

4.2 MEIOS DE CULTURA

4.2.1 Meio NFb (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999)

| | |
|--|----------------|
| Ácido málico | 5 g |
| K ₂ HPO ₄ 10% | 5 mL |
| MgSO ₄ .7H ₂ O 10% | 2 mL |
| NaCl 10% | 1 mL |
| CaCl ₂ 1% | 2 mL |
| Azul de Bromotimol 0,5% em 0,2N de KOH | 2 mL |
| Micronutrientes para meio de Cultura | 2 mL |
| EDTA de Ferro 1,64% | 4 mL |
| Vitamina para Meio de Cultura | 1 mL |
| Hidróxido de Potássio | 4,5 g |
| Extrato de levedura | 50 mg |
| Ágar | 15 g |
| Água destilada | q.s.p. 1000 mL |

Foi adicionado 0,033 g do fungicida Rosa de Bengala, o pH ajustado para 6,5, o meio foi autoclavado a 1 atm em temperatura de 121°C durante 20 minutos e armazenado em temperatura ambiente.

4.2.2 Meio JNFb (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999)

| | |
|--|----------------|
| Ácido málico | 5 g |
| K ₂ HPO ₄ 10% | 6 mL |
| K ₂ HPO ₄ 10% | 18 mL |
| MgSO ₄ .7H ₂ O 10% | 2 mL |
| NaCl 10% | 1 mL |
| CaCl ₂ 1% | 2 mL |
| Azul de Bromotimol 0,5% em 0,2N de KOH | 2 mL |
| Micronutrientes para meio de Cultura | 2 mL |
| EDTA de Ferro 1,64% | 4 mL |
| Vitamina para Meio de Cultura | 1 mL |
| Hidróxido de Potássio | 4,5 g |
| Extrato de levedura | 20 mg |
| Agar | 17 g |
| Água destilada | q.s.p. 1000 mL |

Foi adicionado 0,033 g do fungicida Rosa de Bengala, o pH ajustado para 5,8, o meio foi autoclavado a 1 atm em temperatura de 121°C durante 20 minutos e armazenado em temperatura ambiente.

4.2.3 Solução de Micronutrientes (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999)

| | |
|---|---------|
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0,2 g |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 0,235 g |
| H ₃ BO ₃ | 0,28 g |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,008 g |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0,024 g |
| Água destilada | 1000 mL |

O pH foi ajustado para 6,8, a solução foi autoclavada a 1 atm em temperatura de 121°C durante 20 minutos e armazenada em temperatura ambiente.

4.2.4 Meio LGI (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999)

| | |
|--|----------------|
| Açúcar cristal | 5 g |
| K ₂ HPO ₄ 10% | 2 mL |
| K ₂ HPO ₄ 10% | 6 mL |
| MgSO ₄ .7H ₂ O 10% | 2 mL |
| CaCl ₂ 1% | 2 mL |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O 0,1% | 2 mL |
| Azul de Bromotimol 0,5% em 0,2N de KOH | 5 mL |
| FeCl ₃ .6H ₂ O | 1 mL |
| Vitamina para Meio de Cultura | 1 mL |
| Extrato de levedura | 2 mg |
| Agar | 15 g |
| Água destilada | q.s.p. 1000 mL |

Foram adicionados 0,033 g do fungicida Rosa de Bengala e 1 g de Nitrato de Potássio, o pH ajustado para 6,1, o meio foi autoclavado a 1 atm em temperatura de 121°C durante 20 minutos e armazenado em temperatura ambiente.

4.2.5 Meio LGI-P (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999)

| | |
|--|----------------|
| Açúcar cristal | 100 g |
| K ₂ HPO ₄ 10% | 2 mL |
| K ₂ HPO ₄ 10% | 6 mL |
| MgSO ₄ .7H ₂ O 10% | 2 mL |
| CaCl ₂ 1% | 2 mL |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O 0,1% | 2 mL |
| Azul de Bromotimol 0,5% em 0,2N de KOH | 5 mL |
| FeCl ₃ .6H ₂ O | 1 mL |
| Vitamina para Meio de Cultura | 1 mL |
| Agar | 25 g |
| Água destilada | q.s.p. 1000 mL |

Foi adicionado 0,033 g do fungicida Rosa de Bengala, o pH ajustado para 5,0, o meio foi autoclavado a 1 atm em temperatura de 121°C durante 20 minutos e armazenado em temperatura ambiente.

4.2.6 Solução de Vitaminas (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999)

| | |
|----------------|---------|
| Biotina | 10 mg |
| Piridoxina | 20 mg |
| Água destilada | 1000 mL |

4.2.7 Meio NFbHP (PEDROSA; YATES, 1984; MACHADO *et al.*, 1991)

| | |
|--|-------------------------|
| KH ₂ PO ₄ | 4,0 g |
| K ₂ HPO ₄ | 6,0 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 2,0.10 ⁻¹ g |
| NaCl | 1,0.10 ⁻¹ g |
| CaCl ₂ | 2,0.10 ⁻¹ g |
| Ácido Nitrilo Triacético | 5,6.10 ⁻² g |
| FeSO ₄ . 7 H ₂ O | 2,0.10 ⁻² g |
| Lactato de sódio | 5,0 g |
| Biotina | 1,0.10 ⁻⁴ g |
| Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O | 2,0.10 ⁻³ g |
| MnSO ₄ . H ₂ O | 2,35.10 ⁻³ g |
| H ₃ BO ₃ | 2,8.10 ⁻³ g |
| CuSO ₄ .5 H ₂ O | 8,0.10 ⁻⁵ g |
| ZnSO ₄ .7 H ₂ O | 2,4.10 ⁻⁴ g |
| Água destilada | 1000 mL |

O meio foi autoclavado a 1 atm em temperatura de 121°C durante 20 minutos, foram adicionados 20 mmol/L de NH₄Cl autoclavado e o pH ajustado para 6,8. O meio NFbHP sólido foi obtido adicionando-se ágar bacteriológico ao meio líquido na concentração de 15 g/L e o meio NFbHP semi-sólido foi obtido misturando meio sólido e líquido na proporção de 1/9 no momento do uso.

4.2.8 Meio Nutriente Ágar (ARAÚJO *et al.*, 2002)

| | |
|------------------|------|
| Extrato de carne | 3 g |
| Peptona | 5 g |
| Agar | 15 g |

Foram adicionados 1000 mL de água destilada na quantidade, o pH foi ajustado para 6,8, o meio foi autoclavado a 1 atm em temperatura de 121°C durante 20 minutos e armazenado em temperatura ambiente.

4.2.9 Meio EPM (TOLEDO; FONTES; TRABULSI, 1982)

Preparo final: Solução A (982,5 mL) + Solução B (17,5 mL)

Solução Base A:

| | |
|---|----------------|
| Extrato de carne | 2 g |
| Triptona | 10 g |
| NaCl | 5 g |
| NaH ₂ PO ₄ .5H ₂ O | 2 g |
| L-triptofano | 1 g |
| Azul de Bromotimol 1% | 0,8 mL |
| Agar | 11 g |
| Água destilada | q.s.p. 1000 mL |

O pH foi ajustado para 6,8, o meio foi autoclavado a 1 atm em temperatura de 121°C durante 20 minutos e armazenado em temperatura ambiente.

Solução Base B:

| | |
|--|---------------|
| Citrato de ferro amoniacal | 2,35 g |
| Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O | 2,35 g |
| Glicose | 11,76 g |
| Uréia | 47,06 g |
| Água destilada | q.s.p. 100 mL |

Os compostos foram homogeneizados e aquecidos em banho-maria a 65°C durante 1h, agitando constantemente até completa dissolução.

4.2.10 Meio para Redução de Nitrato (ARAÚJO *et al*, 2002)

| | |
|------------------|----------------|
| Extrato de carne | 3 g |
| Peptona | 5 g |
| KNO ₃ | 1 g |
| Agar | 12 g |
| Água destilada | q.s.p. 1000 mL |

O pH foi ajustado para 6,8, o meio foi autoclavado a 1 atm em temperatura de 121°C durante 20 minutos e armazenado em temperatura ambiente.

4.2.11 Meio Ágar Uréia (ARAÚJO *et al*, 2002)

| | |
|--------------------|----------------|
| Água peptonada | 100 mL |
| Uréia | 10 g |
| Azul de Timol 1,6% | 3 mL |
| Ágar | 15 g |
| Água destilada | q.s.p. 1000 mL |

O pH foi ajustado para 7,0, o meio foi autoclavado a 1 atm em temperatura de 121°C durante 20 minutos e armazenado em temperatura ambiente. Água peptonada: 1 g peptona + 5 g NaCl em 1000 mL de água destilada.

4.2.12 Caldo de Carboidrato (ARAÚJO *et al*, 2002)

| | |
|-------------------------|----------------|
| Extrato de carne | 1 g |
| Carboidrato escolhido | 5 g |
| Peptona | 1 g |
| NaCl | 5 g |
| Vermelho de fenol 0,25% | 7,2 mL |
| Ágar | 15 g |
| Água destilada | q.s.p. 1000 mL |

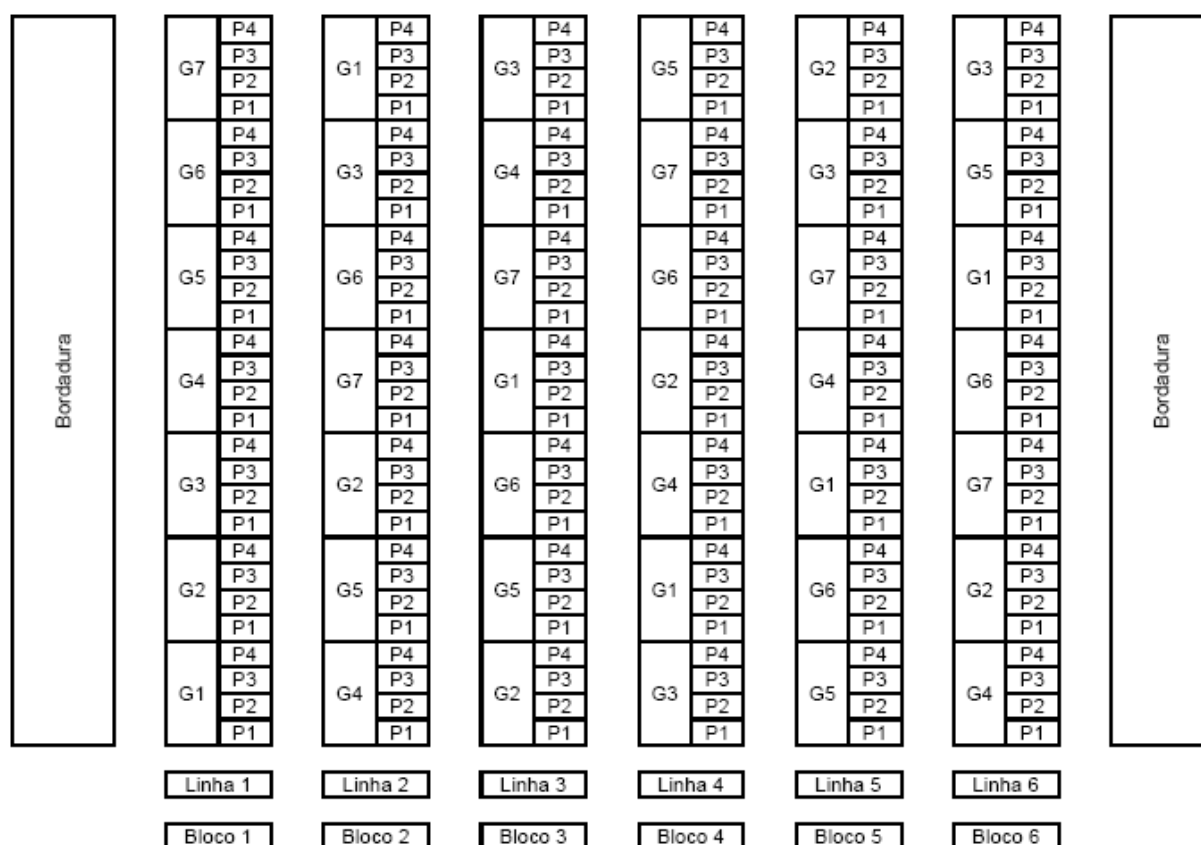
O pH foi ajustado para 7,0, o meio foi autoclavado a 1 atm em temperatura de 121°C durante 20 minutos e armazenado em temperatura ambiente.

4.3 EXPERIMENTO A CAMPO

O delineamento experimental a campo consistiu no plantio de 48 sementes de cada um dos sete genótipos de milho: G1 (Híbrido H1), G2 (Híbrido H2), G3 (Híbrido H3), G4 (Linhagem LA), G5 (Linhagem LB), G6 (Linhagem LC) e G7 (Linhagem LD). O delineamento de blocos ao acaso e foram usadas seis repetições por genótipo,

em um total de quatro plantas por repetição. Nas laterais das linhas foi plantada uma bordadura com sementes do híbrido H2 com uma distância de 20 cm entre as plantas. A distância entre as linhas foi de 70 cm, entre materiais de 60 cm e entre as covas 20 cm (QUADRO 1 e FIGURA 3A) e o solo recebeu irrigação a cada dois dias. Foi realizado o plantio de duas sementes por cova, para posterior desbaste e manutenção de uma só planta. O desbaste foi realizado após o surgimento da 2ª para a 3ª folha verdadeira, no 15º dia após o plantio (FIGURA 3B). A coleta foi feita 75 dias depois da semeadura, logo após o período de florescimento. As raízes coletadas foram submetidas ao isolamento das bactérias endofíticas conforme item 4.4.

QUADRO 1 – CROQUI DA DISPOSIÇÃO ALEATÓRIA DO PLANTIO DOS GENÓTIPOS (G1, G2, G3, G4, G5, G6 E G7) EM 06 LINHAS E COM 04 REPETIÇÕES DE CADA PLANTA (P1, P2, P3 E P4)





FONTE: A autora (2009)

FIGURA 3 – DISPOSIÇÃO DO PLANTIO EM LINHAS E PLANTAS EM ÉPOCA DE DESBASTE

A) Disposição do plantio dos genótipos em 06 linhas e bordaduras laterais esquerda e direita. B) Crescimento de duas plantas por cova para desbaste após 15 dias do plantio

4.4 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS

A partir de fragmentos radiculares desinfestados superficialmente foram isoladas bactérias endofíticas do milho. Foi utilizada uma planta de cada repetição de todos os genótipos (1 x 6 x 7), totalizando 42 raízes.

Para o processo de desinfestação as amostras foram inicialmente lavadas em água corrente para remoção do excesso de solo. A desinfestação superficial consistiu em duas imersões em água destilada esterilizada durante um minuto, um minuto em etanol 70%, quatro minutos em hipoclorito de sódio 3%, 30 segundos em etanol 70% e três lavagens em água destilada esterilizada por um minuto (PETRINI, 1986). Após a desinfestação, as raízes foram cortadas assepticamente em 20 fragmentos de aproximadamente 6 mm, sendo que cinco deles foram transferidos para placas de Petri (100 mm) contendo quatro meios de cultivo sólidos, sem adição de nitrogênio (LGI-P o para o isolamento de *Acetobacter diazotrophicus*; LGI para *Azospirillum amazonense*; NFb para *Azospirillum lipoferum*, *A. brasiliense*, *A. irakense* e *A. halopraeferans* e JNFb para *Herbaspirillum* spp.) (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995).

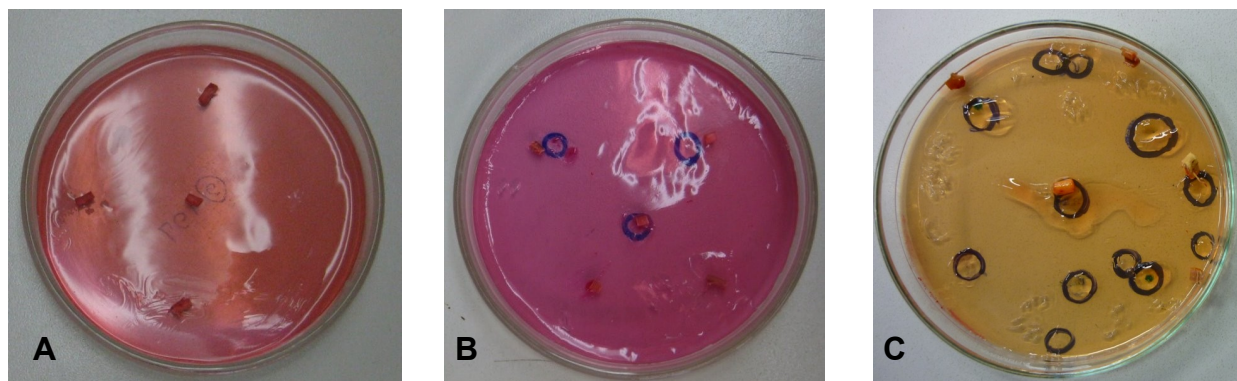
De cada repetição dos genótipos foi retirada uma raiz com cinco pedaços distribuídos nos quatro meios semi-seletivos diferentes (6 x 7 x 5 x 4) totalizando 168 placas. Destas, foram selecionadas 138 placas que apresentaram crescimento de colônias e de cada uma delas, foram retiradas três colônias (138 x 3) resultando em 414 isolados iniciais. Após a purificação das colônias por riscagem, foram obtidos 217 isolados identificados pela linha de origem, pelo genótipo e pela repetição. As colônias foram nomeadas de acordo com o meio na qual cresceram, como apresentado no QUADRO 2.

Das placas que apresentaram crescimento bacteriano (FIGURA 4) foram retiradas três colônias para purificação por riscagem em meio BDA. (Batata-Dextrose-Ágar) com cerca de quatro riscas por placa e, posteriormente, passadas para meio semi-seletivo com seis riscas por placa (FIGURA 5).

A morfologia das colônias riscadas e células de cada colônia observadas sob microscopia óptica, foi observada nas placas de isolamento dos meios semi-específicos (LGI-P, LGI, NFb e JNFb), segundo Reis Junior *et al.* (2000).

QUADRO 2 – NOMENCLATURA DAS AMOSTRAS DE ACORDO COM A LINHA (L), O GENÓTIPO (G), REPETIÇÃO DA PLANTA (P) DE ONDE FORAM RETIRADAS AS AMOSTRAS E MEIO DE CULTURA DO CRESCIMENTO DA COLÔNIA (N: Nfb, J: JNfb, L: LGI E P: LGI-P)

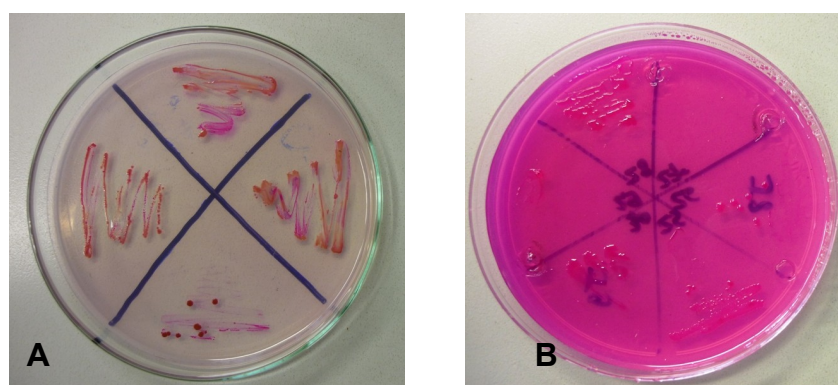
| Amostra | Genótipo | Raiz | Amostra | Genótipo | Raiz | Amostra | Genótipo | Raiz | Amostra | Genótipo | Raiz |
|---------|----------|------|---------|----------|------|---------|----------|------|---------|----------|------|
| N1.B | L1G1P3 | 1A | N1.118 | L6G6P2 | 41A | L1.B | L1G2P1 | 2C | L1.112 | L6G6P2 | 41C |
| N1.D | L1G3P2 | 3A | N1.119 | L6G6P2 | 41A | L1.C | L1G3P2 | 3C | L1.113 | L6G7P4 | 42C |
| N1.03 | L1G1P3 | 1A | N1.120 | L6G7P4 | 42A | L1.08 | L2G3P2 | 3C | L1.114 | L6G7P4 | 42C |
| N1.06 | L1G2P1 | 2A | N1.121 | L6G7P4 | 42A | L1.09 | L1G3P2 | 3C | L1.115 | L6G7P4 | 42C |
| N1.08 | L1G3P2 | 3A | N1.122 | L6G7P4 | 42A | L1.10 | L1G4P1 | 4C | L2.01 | L1G1P3 | 1C |
| N1.09 | L1G3P2 | 3A | N2.01 | L1G1P3 | 1A | L1.12 | L1G4P1 | 4C | L2.02 | L1G1P3 | 1C |
| N1.15 | L1G5P4 | 5A | N2.03 | L1G1P3 | 1A | L1.13 | L1G5P4 | 5C | L2.04 | L1G2P1 | 2C |
| N1.17 | L1G6P2 | 6A | N2.06 | L1G3P2 | 3A | L1.14 | L1G5P4 | 5C | L2.05 | L1G2P1 | 2C |
| N1.43 | L3G1P2 | 15A | N2.07 | L1G3P2 | 3A | L1.15 | L1G5P4 | 5C | L2.06 | L1G2P1 | 2C |
| N1.44 | L3G1P2 | 15A | N2.09 | L1G4P1 | 4A | L1.17 | L1G6P2 | 6C | L2.07 | L4G4P3 | 25C |
| N1.46 | L3G2P4 | 16A | N2.12 | L1G4P1 | 4A | L1.18 | L1G6P2 | 6C | L2.08 | L4G4P3 | 25C |
| N1.50 | L3G3P1 | 17A | N2.13 | L1G5P4 | 5A | L1.22 | L2G1P4 | 8C | L2.09 | L4G4P3 | 25C |
| N1.51 | L3G3P1 | 17A | N2.17 | L2G1P4 | 8A | L1.23 | L2G1P4 | 8C | L2.10 | L2G1P4 | 8C |
| N1.60 | L3G6P4 | 20A | N2.18 | L2G1P4 | 8A | L1.24 | L2G1P4 | 8C | L2.11 | L2G1P4 | 8C |
| N1.64 | L4G1P3 | 22A | N2.20 | L2G1P4 | 8A | L1.25 | L2G2P1 | 9C | L2.12 | L2G1P4 | 8C |
| N1.65 | L4G1P3 | 22A | N2.21 | L2G2P1 | 9A | L1.26 | L2G2P1 | 9C | L2.13 | L2G2P1 | 9C |
| N1.66 | L4G1P3 | 22A | N2.23 | L2G2P1 | 9A | L1.33 | L2G4P4 | 11C | L2.14 | L2G2P1 | 9C |
| N1.70 | L4G3P4 | 24A | N2.24 | L2G2P1 | 9A | L1.35 | L2G5P3 | 12C | L2.15 | L2G2P1 | 9C |
| N1.72 | L4G3P4 | 24A | N2.26 | L2G3P2 | 10A | L1.36 | L2G5P3 | 12C | L2.17 | L6G2P3 | 37C |
| N1.73 | L4G4P3 | 25A | N2.32 | L2G4P4 | 11A | L1.41 | L2G7P4 | 14C | L2.19 | L6G7P4 | 42C |
| N1.74 | L4G4P3 | 25A | N2.33 | L2G5P3 | 12A | L1.42 | L2G7P4 | 14C | L2.20 | L6G7P4 | 42C |
| N1.76 | L4G5P2 | 26A | N2.35 | L2G5P3 | 12A | L1.43 | L3G1P2 | 15C | L2.21 | L6G7P4 | 42C |
| N1.78 | L4G5P2 | 26A | N2.37 | L3G3P1 | 17A | L1.44 | L3G1P2 | 15C | L2.22 | L2G5P3 | 12C |
| N1.81 | L4G6P4 | 27A | N2.40 | L3G3P1 | 17A | L1.45 | L3G1P2 | 15C | L2.24 | L2G5P3 | 12C |
| N1.82 | L4G7P4 | 28A | N2.42 | L3G4P1 | 18A | L1.47 | L3G2P4 | 16C | L2.25 | L6G4P4 | 39C |
| N1.83 | L4G7P4 | 28A | N2.45 | L3G5P2 | 19A | L1.48 | L3G2P4 | 16C | L2.26 | L6G4P4 | 39C |
| N1.84 | L4G7P4 | 28A | N2.48 | L3G5P2 | 19A | L1.49 | L3G3P1 | 17C | L2.27 | L6G4P4 | 39C |
| N1.85 | L5G1P2 | 29A | N2.49 | L4G5P4 | 26A | L1.52 | L3G4P1 | 18C | L2.28 | L6G6P2 | 41C |
| N1.86 | L5G1P2 | 29A | N2.51 | L4G5P4 | 26A | L1.54 | L3G4P1 | 18C | L2.29 | L6G6P2 | 41C |
| N1.89 | L5G3P4 | 31A | N2.54 | L5G7P3 | 35A | L1.55 | L3G5P2 | 19C | L2.30 | L6G6P2 | 41C |
| N1.90 | L5G3P4 | 31A | N2.55 | L5G7P3 | 35A | L1.58 | L3G6P4 | 20C | P1.B | L1G2P1 | 2D |
| N1.91 | L5G3P4 | 31A | N2.57 | L6G5P2 | 40A | L1.63 | L3G7P3 | 21C | P1.C | L1G1P3 | 1D |
| N1.92 | L5G4P2 | 32A | N2.59 | L6G5P2 | 40A | L1.73 | L4G4P3 | 25C | P1.01 | L1G1P3 | 1D |
| N1.93 | L5G4P2 | 32A | J1.58 | L6G3P3 | 38B | L1.75 | L4G4P3 | 25C | P1.03 | L1G1P3 | 1D |
| N1.94 | L5G4P2 | 32A | J1.59 | L6G3P3 | 38B | L1.77 | L4G6P4 | 27C | P1.04 | L1G1P3 | 2D |
| N1.95 | L5G5P3 | 33A | J1.60 | L6G3P3 | 38B | L1.80 | L4G7P4 | 28C | P1.05 | L1G2P1 | 2D |
| N1.96 | L5G5P3 | 33A | J1.61 | L6G4P4 | 39B | L1.82 | L4G7P4 | 28C | P1.06 | L1G2P2 | 2D |
| N1.97 | L5G5P3 | 33A | J1.64 | L6G5P2 | 40B | L1.86 | L5G4P2 | 32C | P1.08 | L1G3P2 | 3D |
| N1.98 | L5G6P4 | 34A | J1.65 | L6G5P2 | 40B | L1.87 | L5G4P2 | 32C | P1.09 | L1G3P2 | 3D |
| N1.100 | L5G6P4 | 34A | J1.66 | L6G5P2 | 40B | L1.88 | L5G4P2 | 32C | P1.28 | L2G5P3 | 12D |
| N1.101 | L5G7P3 | 35A | J1.67 | L6G6P2 | 41B | L1.93 | L5G6P4 | 34C | P1.29 | L2G5P4 | 12D |
| N1.102 | L5G7P3 | 35A | J1.68 | L6G6P2 | 41B | L1.98 | L6G2P3 | 37C | P1.30 | L2G5P5 | 12D |
| N1.103 | L5G7P3 | 35A | J1.69 | L6G6P2 | 41B | L1.99 | L6G2P3 | 37C | P1.88 | L6G6P2 | 41D |
| N1.104 | L6G1P1 | 36A | J1.70 | L6G7P4 | 42B | L1.101 | L6G3P3 | 38C | P1.92 | L6G7P4 | 42D |
| N1.105 | L6G2P3 | 37A | J1.71 | L6G7P4 | 42B | L1.102 | L6G3P3 | 38C | P2.01 | L1G1P3 | 1D |
| N1.107 | L6G2P3 | 37A | J1.72 | L6G7P4 | 42B | L1.103 | L6G3P3 | 38C | P2.02 | L1G1P4 | 1D |
| N1.108 | L6G3P3 | 38A | J2.25 | L6G4P4 | 39B | L1.104 | L6G4P4 | 39C | P2.03 | L1G1P5 | 1D |
| N1.109 | L6G3P3 | 38A | J2.26 | L6G4P4 | 39B | L1.105 | L6G4P4 | 39C | P2.07 | L1G2P1 | 2D |
| N1.110 | L6G3P3 | 38A | J2.28 | L6G5P2 | 40B | L1.106 | L6G4P4 | 39C | P2.08 | L1G2P1 | 2D |
| N1.112 | L6G4P4 | 39A | J2.29 | L6G5P2 | 40B | L1.107 | L6G5P2 | 40C | P2.09 | L1G2P1 | 2D |
| N1.113 | L6G4P4 | 39A | J2.30 | L6G5P2 | 40B | L1.108 | L6G5P2 | 40C | P2.10 | L1G2P1 | 2D |
| N1.115 | L6G5P2 | 40A | L1.01 | L1G1P3 | 1C | L1.109 | L6G5P2 | 40C | P2.11 | L1G2P1 | 2D |
| N1.116 | L6G5P2 | 40A | L1.04 | L1G2P1 | 2C | L1.110 | L6G6P2 | 41C | P2.12 | L1G2P1 | 2D |
| N1.117 | L6G6P2 | 41A | L1.07 | L1G3P2 | 3C | L1.111 | L6G6P2 | 41C | P2.22 | L1G2P1 | 2D |



FONTE: A autora (2009)

FIGURA 4 – PLACAS CONTENDO MEIOS SEMI-SELETIVOS E FRAGMENTOS DE RAÍZES PARA ISOLAMENTO DAS COLÔNIAS

A) Placa com meio LGI sem crescimento de colônias. B) Placa com meio NFB com crescimento de 3 colônias. C) Placa com meio LGI-P com crescimento de 12 colônias



FONTE: A autora (2009)

FIGURA 5 – PLACAS CONTENDO COLÔNIAS RISCADAS PARA A PURIFICAÇÃO

A) Placa com meio BDA com quatro riscas de colônias. B) Placa com meio JNFB com seis riscas de colônias

4.5 ARMAZENAMENTO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS

Após seleção aleatória, as colônias foram nomeadas de acordo com o genótipo de onde foram retiradas e o meio na qual cresceram, repicadas em tubos de ensaio contendo meio semi-seletivo NFB, JNFB, LGI e LGI-P, mantidas a 30°C até o crescimento e armazenadas na geladeira em temperatura de 4°C. A partir do

material estocado, foram realizados os testes de caracterização morfofisiológica e molecular.

4.6 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLOGICA DAS COLÔNIAS ISOLADAS

A identificação dos microrganismos foi realizada através da determinação de um número mínimo de propriedades, como características morfológicas e bioquímicas.

Após a purificação das colônias por riscagem, foram obtidas 217 amostras utilizadas para caracterização morfológica. O processo de identificação foi realizado por meio da observação das características de cada colônia analisada a partir das placas de isolamento. Os critérios analisados foram: tamanho (puntiforme menor que 0,5 mm); forma (circular, irregular ou rizóide); bordas (lisa, lobada, denteada ou ondulada); superfície (lisa, rugosa, pregueada, raiada); consistência (cremosa, viscosa, granulosa ou seca); transparência (opaca, translúcida ou transparente); coloração (amarelo ouro, amarelo citrina, amarelo claro, vermelho, rosada, branca, castanha ou alaranjada); brilho (fosco ou brilhante); elevação (convexa alta, acuminada, centro-saliente, centro deprimida, convexa baixa, espreada, umbilicada ou papiliforme) (UFBA, 2008a).

4.6.1 Coloração de Gram

O teste de Gram foi realizado segundo Pelczar, Chan e Krieg (1996).

4.6.2 Teste de Catalase

Em uma placa de Elisa foram colocados 10 µL de cada amostra crescida em meio Nutriente Ágar líquido acrescido de 5 µL de peróxido de hidrogênio sendo observada a formação de gás (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000).

4.6.3 Teste de Urease

As amostras foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio EPM inclinado em temperatura de 30°C por 48 h. Além da atividade da urease, também foi avaliada a fermentação da glicose, através da produção de gás no meio. A prova foi realizada segundo Araújo *et al.* (2002).

4.6.4 Teste de Redução do Nitrato

As amostras foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio Nitrato em temperatura de 30°C por 48 h. Após o crescimento das colônias foram adicionadas duas gotas da solução A (160 µL de ácido sulfanílico; 20 mL de ácido acético 5 N) e duas gotas da solução B (100 µL de α -naftilamina; 20 mL de ácido acético 5 N) dos reagentes para o teste de nitrato. A prova foi realizada segundo Araújo *et al.* (2002).

4.6.5 Teste de Crescimento em Fonte de Carbono

A capacidade de crescimento bacteriano foi avaliada utilizando as seguintes fontes de carbono: dextrose, frutose, galactose, lactato, malato, manitol e sacarose. As placas foram feitas em triplicata para cada fonte, onde foram adicionadas ao meio de cultura Caldo de Carboidrato sólido as diferentes fontes de carbono. Cada placa foi constituída de 50 quadrantes onde foram inoculados 3µL da amostra de cada isolado crescido em meio Nutriente Àgar Líquido e incubada em temperatura de 30°C. O crescimento das colônias em cada quadrante foi acompanhado pelo período de 48 h.

4.6.6 Teste de Tolerância Intrínseca a Antibióticos

Os antibióticos utilizados foram Amoxicilina e Tetraciclina nas concentrações de 50 µg/mL, 150 µg/mL e 300 µg/mL. Os testes foram realizados em triplicata, onde os antibióticos estéreis foram adicionados ao meio de cultura Nutriente Àgar em

temperatura de 35°C. Cada placa foi constituída de 50 quadrantes onde foram inoculados 3µL da amostra de cada isolado crescido em meio Nutriente Ágar líquido e incubada em temperatura de 30°C. As placas foram mantidas em estufa envoltas em papel alumínio e o crescimento das colônias em cada quadrante foi acompanhado pelo período de 48 h.

4.6.7 Teste de Fixação de Nitrogênio

Com auxílio de alça de platina, foram inoculadas colônias em meio líquido NFb lactato, incubadas em agitador à 120 rpm, em temperatura de 30°C, durante 48 h. Das amostras que apresentaram crescimento positivo, 30 µL foram inoculados em frascos-ampola contendo 4 mL de meio semi-sólido NFb lactato e o crescimento foi observado até a formação de um halo característico em aproximadamente 24h. Após a formação do halo, foram inoculados 0,6 mL de gás acetileno e as amostras incubadas a 30°C por 1 h. Após este período, ainda a 30 °C foi retirado 0,5 mL da fase gasosa das amostras e aferidas as porcentagens de etileno produzido através de cromatografia gasosa.

4.7 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

4.7.1 Extração de DNA

O DNA dos isolados foi extraído como descrito por Kaschuk *et al.* (2006). As bactérias foram cultivadas em tubos de 2,0 mL contendo meio líquido NFb e mantidas sob agitação de 120 rpm durante 48 h em temperatura de 30°C. As culturas de bactérias foram então centrifugadas a 13.200 g durante 15 minutos e lavadas por três vezes com 750 µL de PBS (1,745 g de NaCl; 0,568 g de Na₂HPO₄ anidro; 100 mL de água ultrapura; pH 7,4, mantido a 4°C). Após a última lavagem o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 400 µL de TE 50:20 (5 mL de Tris-HCl 1 M pH 8,0; 4 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0; 100 mL de água ultrapura). Foram adicionados 50 µL de SDS (10 g de Dodecil sulfato de sódio; 100 mL de água

ultrapura), 10 µL de Lisozima (5 mg/mL), 5 µL de Proteinase K (20 mg/mL) e 1 µL de RNase (10 mg/mL). A mistura foi homogenizada lentamente por inversão e incubada a 37°C durante uma hora. Foram acrescentados 30 µL de NaCl 0,25 M e 60 µL de AcNa 0,3 M. As amostras foram homogeneizadas lentamente e deixadas em repouso por uma hora a 4°C. Em seguida foi realizada centrifugação a 13.200 g durante 15 minutos e o sobrenadante recolhido (aproximadamente 400 µL) e transferido para tubos de 1,5 mL. Foi adicionado duas vezes o volume de Etanol 95% (800µL) e a incubação realizada em temperatura de -20°C “overnight”. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 13.200 g durante 15 minutos, o etanol foi descartado, os precipitados colocados para secar em temperatura ambiente durante aproximadamente 2 h e, em seguida, ressuspensos em água ultrapura estéril. O DNA extraído foi estocado a -20°C.

O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria (diluição de 1:50 e absorbâncias em 260 nm, 280 nm e 320nm) e sua integridade verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 1X pH 8,0, a 110V durante 1 h 30min. Foram aplicados 10 µL de amostra adicionados a 5 µL de tampão e 10 µL de marcador de peso molecular (DNA de fago lambda clivado com *Hind* III, Gibco). A visualização ocorreu após coloração com brometo de etídio, sob luz ultravioleta e fotografadas por uma câmera digital. Quando houve utilização de GelRed™ (Biotium, Estados Unidos), não foi necessária a coloração em brometo de etídio.

4.7.2 Caracterização Genética por BOX-PCR

A caracterização genética foi realizada através da amplificação por PCR, usando o “primer” específico BOX A1R (5’CTACGGCAAGGCGACGCTGACG3’, Invitrogen™).

A reação foi realizada de acordo com as condições descritas por Kaschuk *et al.* (2006), contendo: 1 µL de DNA 50 ng; 2,5 µL de tampão PCR 1x; 0,3 µL de *Taq* DNA polimerase 1,5 U/r; 0,3 µL de “primer” 0,6 µM; 3 µL de dNTPs; 1,5 µL de MgCl₂ 3 mM, com um volume final de 25 µL. A amplificação seguiu uma desnaturação inicial a 95°C por 7 min.; 35 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 53°C, e 3 min. a 72°C; e extensão final de 4 min. a 72°C.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese a 85V em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 1X pH 8,0. Foram aplicados 25 µL de amostra adicionados a 5 µL de tampão GelRed™ 2x e, também, aplicados 10 µL de marcador de peso molecular (DNA Ladder 100pb LUDWIG BIOTEC). Após 2 horas de corrida, os géis foram visualizados em um transluminador com lâmpada UV e fotografados por uma câmera digital.

4.7.3 Análise de dados

A partir dos resultados da caracterização morfológica, Coloração de Gram, Catalase, Urease, Crescimento em Fontes de Carbono, Crescimento Intrínseco em Antibióticos, Fixação de Nitrogênio, Redução de Nitrato e BOX-PCR, foi construída uma matriz binária para análise de dados usando o programa NTSYS (“Numerical Taxonomy System”) versão 2.02i (ROHLF, 1988), o qual utiliza o coeficiente de Jaccard para obtenção de uma matriz de similaridade seguido por agrupamento pela metodologia UPGMA. Em seguida, foi realizada a análise de “bootstrap” com o “software” BOOD com 10.000 repetições (COELHO, 2000).

4.7.4 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA dos isolados

A reação foi realizada com os “primers” Y3 e 16S786f cujas sequências estão no QUADRO 3. A reação foi realizada com as seguintes condições: 5 µL de tampão PCR 1x, 1,5 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 4 µL de dNTP (2 µM), 1 µL de cada “primer” (2 µM), 0,3 µL de *Taq* DNA polimerase (1,5 U/r), 5 µL de DNA (10 ng/µL) e 32,2 µL de água ultrapura para o volume final de 50 µL.

A amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf® modelo “Mastercycler Gradient”, com desnaturação inicial a 94° C por 2 min.; 35 ciclos de 30 s a 94° C, 1 min. a 55° C, 1 min. a 72° C; seguida de extensão final de 3 min. a 72° C. Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados e quantificados em gel de agarose 1% (p/v) com o marcador de massa “Low DNA Mass Ladder” Invitrogen®.

4.7.4.1 Purificação do DNA

Aos produtos da amplificação das PCRs com os “primers” descritos anteriormente, foram acrescentados 50 µL de PEG (PEG 20%, NaCl 2,5 M) e incubados a 37°C por 30 minutos. Após este período, os tubos foram centrifugados por 20 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao restante foram adicionados 125 µL de etanol 80% gelado. Após 1 minuto em etanol 80% os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao restante foram adicionados 125 µL de etanol absoluto gelado, pela parede do tubo. Novamente o sobrenadante foi descartado e o restante do etanol evaporado.

O “pellet” resultante foi ressuspendido em 15 µL de água ultrapura e deixado em temperatura ambiente por 2 horas. Após a purificação, os produtos da PCR foram quantificados em gel de agarose 1% (p/v) com o marcador de massa “Low DNA Mass Ladder” Invitrogen®.

4.7.4.2 Reação de Sequenciamento

O sequenciamento da região 16S rRNA foi realizado pelo método de terminação de cadeia, utilizando a incorporação de dideoxynucleotídeos fluorescentes, em Sequenciador Automático de DNA (SANGER; NICKLEN e COULSON, 1977).

Para reação foram utilizadas de 50 a 100 ng do produto da PCR purificado, 0,25 µM do “primer” Y3 (QUADRO 3), 2 µL da mistura para sequenciamento ET (kit “DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE” da Amersham Biosciences®) e água ultrapura quando necessária para completar um volume final de 10 µL. As mesmas condições foram aplicadas para o “primer” 16S786f (QUADRO 3). A amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf® Modelo “Mastercycler Gradient”, seguindo uma desnaturação inicial a 94° C por 2 min.; 35 ciclos de 20 s a 94° C, 15 s a 50° C e 1 min. a 60° C.

4.7.4.3 Purificação da Reação de Sequenciamento

Ao produto da reação de sequenciamento foram adicionados 1 µL de acetato de amônio 7,5 M e 27,5 µL de etanol absoluto. A placa de sequenciamento foi fechada e o conteúdo misturado por inversão por 30 vezes. A placa foi centrifugada por 45 minutos a 2.500 rcf e o sobrenadante descartado. Após um “spin down” (com a placa invertida em papel toalha) a 500 rcf foram adicionados 100 µL de etanol 70% recém preparado. Seguiu-se uma centrifugação a 2.500 rcf com a placa aberta. O sobrenadante foi descartado e um “spin down” a 750 rcf foi realizado. As amostras foram colocadas na estufa a 37°C por 3 minutos e 10 µL de “Loading Solution” (kit “DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE” da Amersham Biosciences®) foram adicionados a cada reação. A placa foi fechada com adesivo, envolvida em papel alumínio e agitada no vórtex por 1 minuto. Após um “spin” a 2500 rcf, a placa foi submetida à eletroforese em Sequenciador Automático de DNA modelo MegaBACE Amersham Biosciences®.

Os parâmetros de eletroforese selecionados durante o sequenciamento foram: voltagem de injeção de 2kV, tempo de injeção de 70 s, voltagem da corrida de 6 kV e tempo de corrida de 100 minutos. As corridas efetuadas foram analisadas através de programas disponíveis no pacote de “softwares” do MegaBACE. O “Sequence Analyser” gerou os eletroferogramas de cada isolado e através do programa “ScoreCard” foram obtidas as informações estatísticas de cada sequência, como número de nucleotídeos obtidos e a eficiência.

4.7.4.4 Edição e Comparação em banco de dados

A edição das sequências obtidas foi realizada utilizando o programa MEGA versão 4.0 (TAMURA *et al.*, 2006) e posterior inspeção visual através do programa BioEdit versão 7.0 (HALL, 2005) onde as sequências obtidas foram alinhadas e comparadas com outras sequências existentes no GenBank pelo programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997), o qual permite detectar similaridade de uma sequência biológica com sequências caracterizadas já existentes. Para análise das sequências obtidas no presente trabalho, foi utilizada a opção BLASTn que compara sequências de nucleotídeos com um banco de dados de sequências de nucleotídeos.

QUADRO 3 – “PRIMERS” INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO 16S rRNA

| NOME | SEQUÊNCIA (5' --- 3') | COMPRIMENTO | GC% | T _m (°C) |
|-------------------|----------------------------|-------------|------|---------------------|
| DIRETO 16S786f | CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG | 23 pb | 60,9 | 74,85 |
| REVERSO Y3 | TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC | 26 pb | 50 | 67,71 |

Fonte: PISA (2006)

5 RESULTADOS

5.1 ESTABELECIMENTO DA COLEÇÃO DE ISOLADOS BACTERIANOS

Foram isoladas 414 colônias bacterianas, sendo que 217 isolados foram caracterizados por meio de oito parâmetros morfológicos, 98 isolados foram caracterizados bioquimicamente por meio de sete parâmetros e 93 isolados foram caracterizados geneticamente pela técnica de BOX-PCR e 35 isolados tiveram o gene 16S rDNA parcialmente sequenciado. O resultado da análise de solo amostrada foi realizada pela Fundação para Assistência e Divulgação Técnica Agropecuária – ABC (Carambeí – PR) e encontra-se em anexo.

5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foi realizada uma análise de experimento fatorial a partir de dados de contagem das colônias crescidas nos quatro meios de cultura do isolamento, analisadas no “software” Assistat (SILVA, 1996). Os principais dados estão apresentados na TABELA 1 e a análise completa encontra-se no ANEXO I. O resultado indicou diferença estatística significativa quanto ao fator 2, representativo dos quatro meios de cultivo utilizados. Não houve, portanto, diferença no número de colônias identificado na média de cada um dos sete genótipos testados para o isolamento bacteriano (fator 1).

TABELA 1 – DADOS ESTATÍSTICOS DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

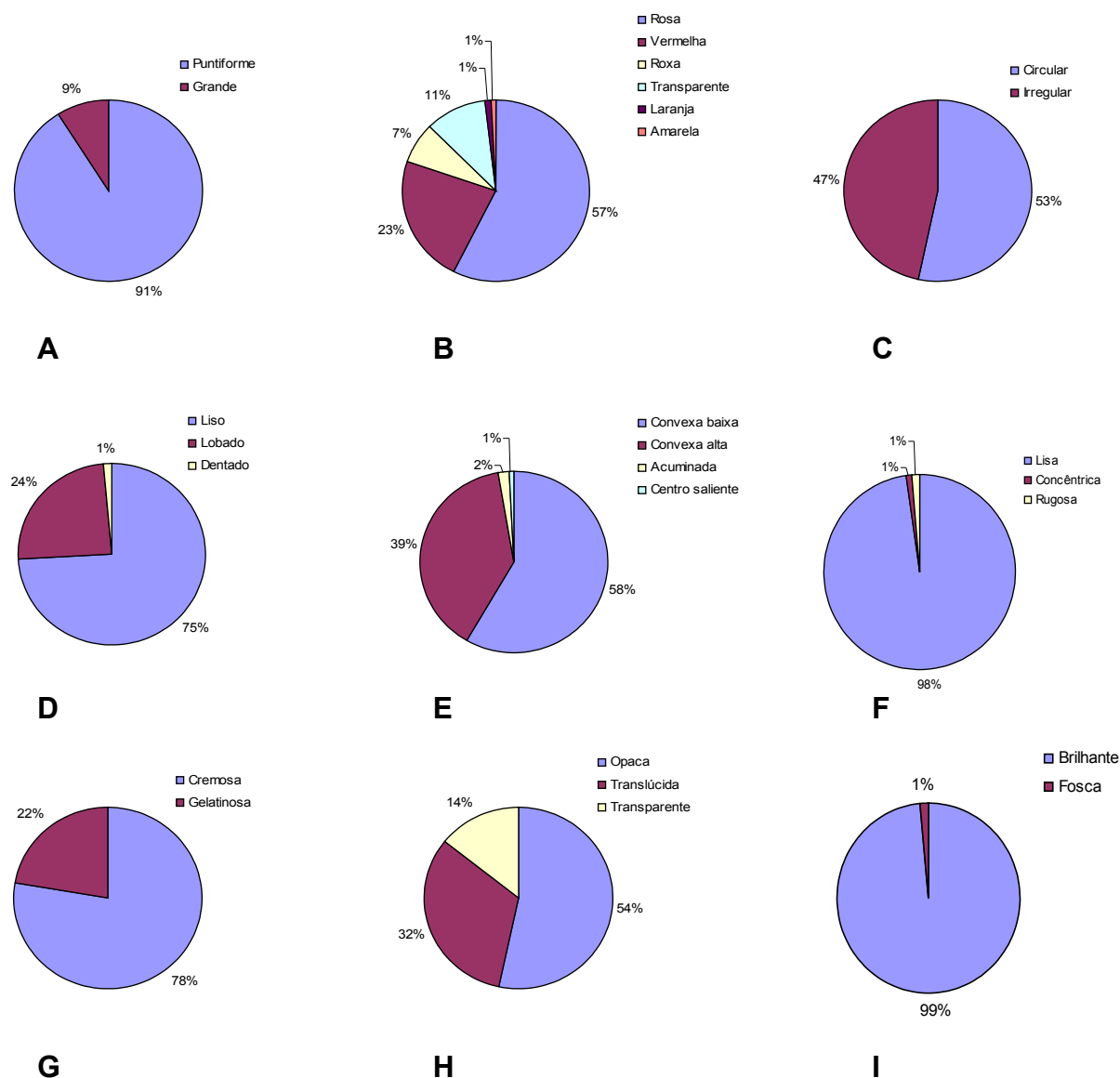
| F.V. | G.L. | S.Q. | Q.M. | F |
|-------------|------|-----------|---------|------------|
| Fator1 (F1) | 6 | 2.98447 | 0.49741 | 0.8329 ns |
| Fator2 (F2) | 3 | 29.09284 | 9.69761 | 16.2388 ** |
| Int. F1xF2 | 18 | 2.95688 | 0.16427 | 0.2751 ns |
| Tratamentos | 27 | 35.03419 | 1.29756 | 2.1728 ** |
| Blocos | 5 | 37.93388 | 7.58678 | 12.7042 ** |
| Resíduo | 135 | 80.62019 | 0.59719 | |
| Total | 167 | 153.58825 | | |

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)
 * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)
 ns não significativo ($p \geq .05$)

5.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA

5.3.1 Morfologia das colônias

Das 217 amostras analisadas quanto à morfologia (FIGURA 6 e APÊNDICE 1), a maioria delas (91%) apresentou tamanho puntiforme (inferior a 0,5 mm) em relação a somente 9% de colônias grandes. No que diz respeito à coloração, houve variação de tonalidades, predominando a coloração rosada. Entretanto, os dados indicam que a presença do fungicida no meio interferiu no padrão de coloração observada, uma vez que na ausência do mesmo não ocorreu variação para esta característica. Quanto às demais características, aproximadamente a metade das colônias apareceu com forma circular e irregular. Também a análise das bordas apresentou apenas 1% dentada, sendo que a maioria foi lisa. Porcentagem superior a 50% foi observada para a característica de baixa convexidade das colônias bem como o padrão de transparência opaco. Ainda, a consistência cremosa foi predominante (78%) em relação à gelatinosa (22%) e a grande maioria apresentou-se brilhante (99%) e com superfície lisa (98%). Para o formato das células observado pela coloração de Gram, 77% são bacilos Gram negativos presentes em todos os meios de cultura e os demais (23%) são cocos Gram positivos, com crescimento exclusivo nos meio NFb, LGI e LGI-P (FIGURA 7).



FONTE: A autora (2009)

FIGURA 6 – DIFERENTES PADRÕES MORFOLÓGICOS OBSERVADOS ENTRE 217 COLÔNIAS DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS INDICANDO A PORCENTAGEM DESTE PARÂMETROS

A) Tamanho. B) Coloração. C) Forma. D) Bordos. E) Elevação. F) Superfície. G) Consistência. H) Transparência. I) Brilho

5.3.2 Testes Bioquímicos

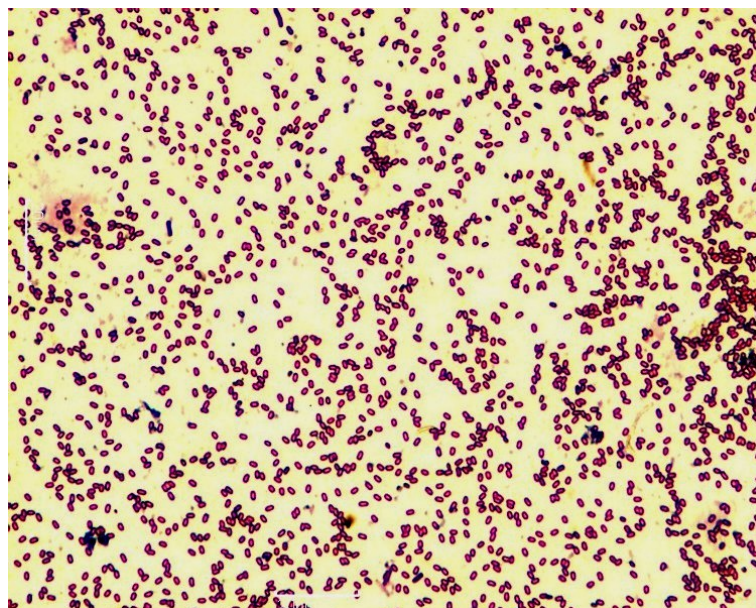
Para os testes enzimáticos foram selecionadas 98 amostras. Todas elas apresentaram atividade de catalase positiva, isto é, houve formação de bolhas de gás imediatamente ou logo após a adição de peróxido de hidrogênio (FIGURA 8 e APÊNDICE 2).

No teste de urease, apenas 8% apresentaram atividade positiva para urease, observada pela cor do meio EPM que apresentou coloração azulada (FIGURA 9A e APÊNDICE 2). Também em meio EMP, foi observada a capacidade de fermentação da glicose pela colônia testada através da formação de gás ocorrida em 37% das amostras (FIGURA 9B).

Quanto à redução do nitrato, 81% apresentaram resultado positivo para a presença de atividade da enzima nitrato redutase. O resultado positivo foi observado pelo aparecimento de uma coloração vermelha intensa na superfície do meio após a adição das soluções dos reagentes para teste de nitrato (FIGURA 10 e APÊNDICE 2).

O teste de crescimento em fonte de carbono demonstrou que ao ser adicionada a dextrose ou frutose em meio Caldo de Carboidrato, 96% do total das amostras apresentaram crescimento, ou seja, o resultado foi positivo para uso dessas fontes. Quando adicionada galactose, manitol ou sacarose, 95% das amostras apresentaram resultado positivo e ao adicionar o malato ao meio, 94% das amostras apresentaram resultado positivo. Já com a adição de lactato, a porcentagem de crescimento foi de 92% (FIGURA 11 e APÊNDICE 2).

No teste de tolerância intrínseca a antibióticos, 20% não cresceram nas concentrações de 50 µg/mL e 300 µg/mL de amoxicilina. Já na concentração de 150 µg/mL, o índice de crescimento das colônias foi um pouco maior (4%) e 16% das amostras não cresceram (FIGURA 12 e APÊNDICE 3). Quando foi adicionado o antibiótico tetraciclina (50 µg/mL), 87% das amostras não cresceram. Para 150 µg/mL e 300 µg/mL de tetraciclina, este percentual aumentou para 97% e 94%, respectivamente (FIGURA 13 e APÊNDICE 3).



FONTE: A autora (2009)

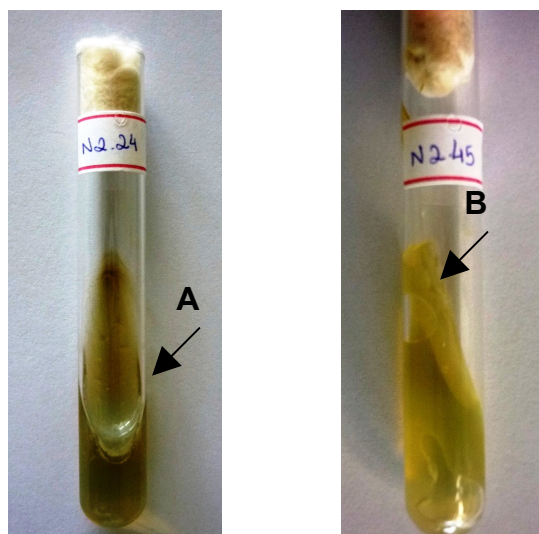
FIGURA 7 – FOTOMICROGRAFIA ÓPTICA ILUSTRANDO A MORFOLOGIA DAS CÉLULAS BACTERIANAS OBSERVADA PELO TESTE DE COLORAÇÃO DE GRAM

Células do tipo bastonetes de colônia cultivada em meio NFb, teste de Gram negativo. Aumento de 400x



FONTE: A autora (2009)

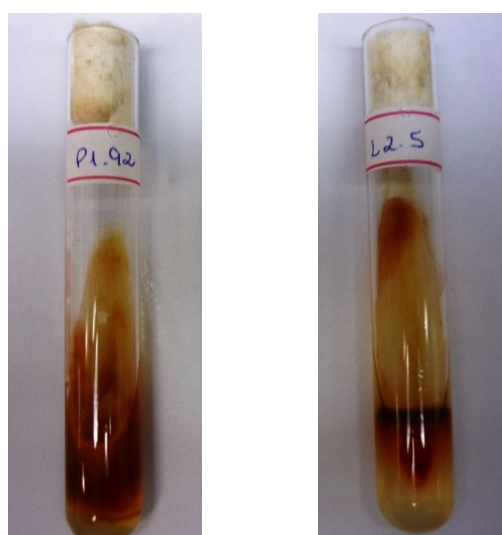
FIGURA 8 – TESTE DE CATALASE POSITIVO PARA TODAS AS AMOSTRAS BACTERIANAS TESTADAS INDICADO PELA FORMAÇÃO DE BOLHAS



FONTE: A autora (2009)

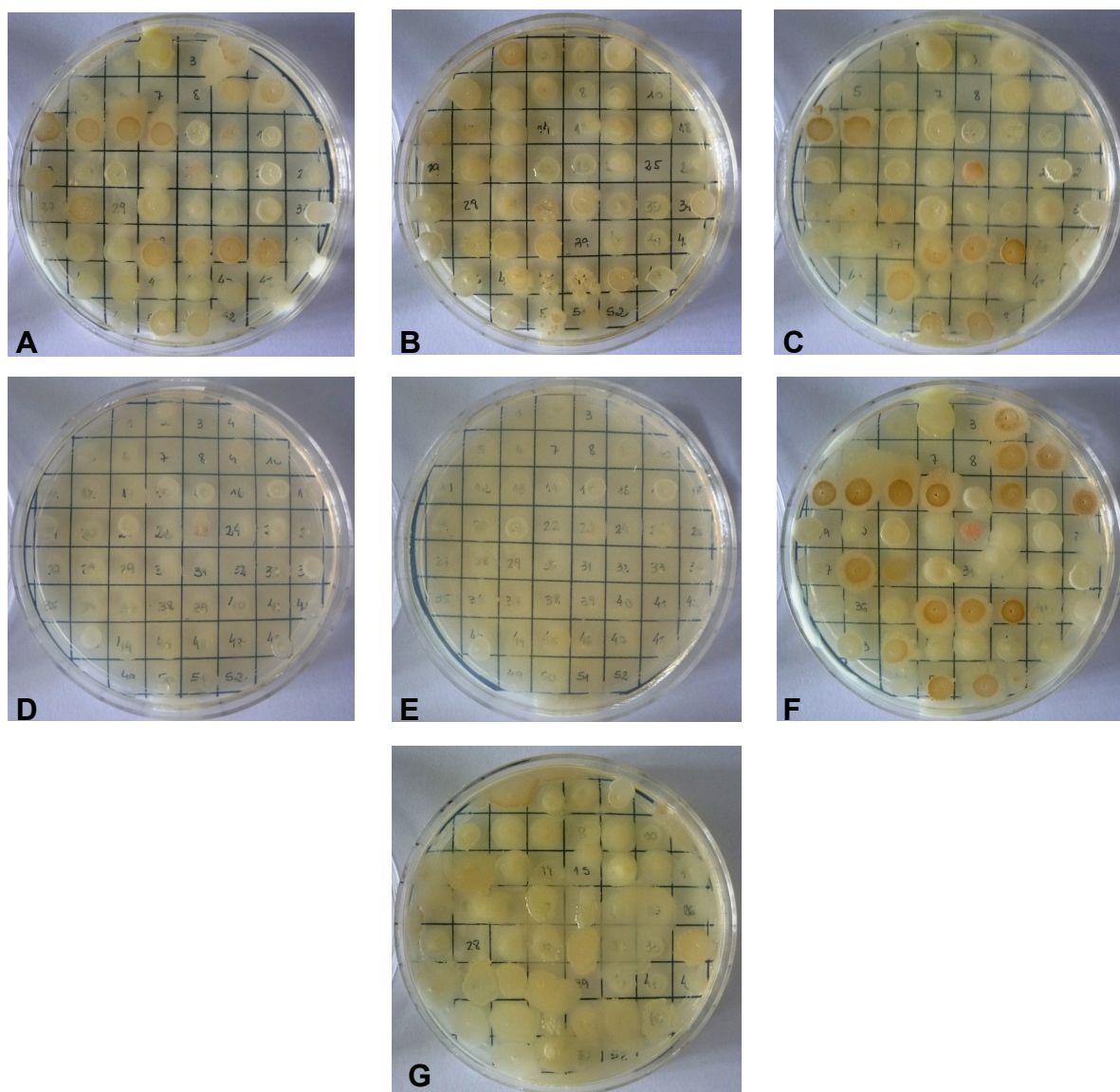
FIGURA 9 – IDENTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE UREASE E DE FERMENTAÇÃO DA GLICOSE EM MEIO EMP

A) Resultado positivo indicado pela coloração azulada do meio. B) Formação de bolha indicando produção de gás



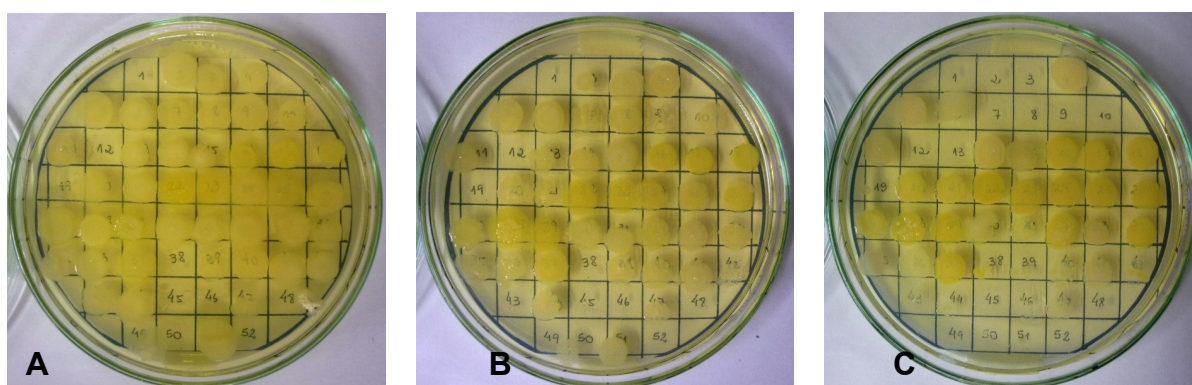
FONTE: A autora (2009)

FIGURA 10 – RESULTADO POSITIVO DO TESTE DE NITRATO OBSERVADO PELA COLORAÇÃO VERMELHA INTENSA COM A ADIÇÃO DAS SOLUÇÕES DO TESTE DE NITRATO EM COLÔNIAS CRESCIDAS



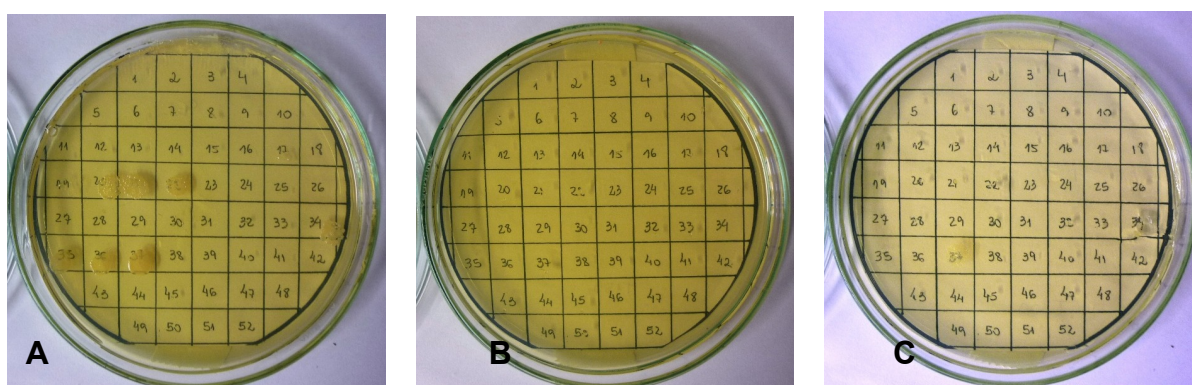
FONTE: A autora (2009)

FIGURA 11 – PLACAS CONTENDO MEIO CALDO DE CARBOIDRATO COM RESULTADO POSITIVO REPRESENTADO PELO CRESCIMENTO DE COLÔNIAS NOS QUADRANTES
Meio com adição de A) Dextrose. B) Frutose. C) Galactose. D) Lactato. E) Malato. F) Manitol. G) Sacarose



FONTE: A autora (2009)

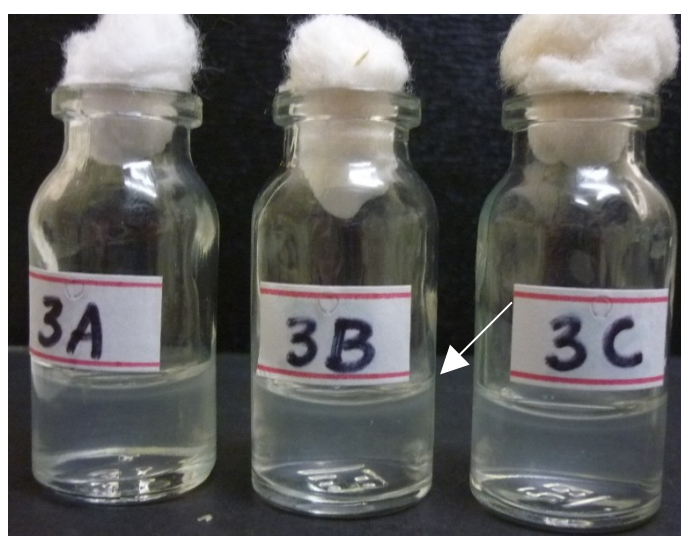
FIGURA 12 – CRESCIMENTO BACTERIANO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ANTIBIÓTICO AMOXICILINA EM PLACAS CONTENDO MEIO NUTRITIVO ÁGAR
Meio com amoxicilina na concentração de A) 50 µg/mL. B) 150 µg/mL. C) 300 µg/mL



FONTE: A autora (2009)

FIGURA 13 – CRESCIMENTO BACTERIANO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ANTIBIÓTICO TETRACICLINA EM PLACAS CONTENDO MEIO NUTRITIVO ÁGAR
Meio com tetraciclina na concentração de A) 50 µg/mL. B) 150 µg/mL. C) 300 µg/mL

Para o teste de fixação de nitrogênio verificou-se que todas as amostras inoculadas em meio semi-sólido apresentaram formação de película indicadora de crescimento bacteriano (FIGURA 14). Quando submetidas ao teste de atividade da nitrogenase, apenas duas amostras (L1.23 e L1.24) apresentaram característica de fixadora de nitrogênio, com etileno aferido próximo aos controles positivos (*Azospirillum brasiliense* e *Herbaspirillum seropedicae*). O restante dos isolados testados apresentaram pico de etileno inferior ao padrão. A TABELA 2 mostra as porcentagens de resultados positivos para cada teste bioquímico realizado.



FONTE: A autora (2009)

FIGURA 14 – TESTE DE FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO COM FORMAÇÃO DA PELÍCULA EM MEIO SEMI-SÓLIDO NFb LACTATO INDICANDO CRESCIMENTO BACTERIANO

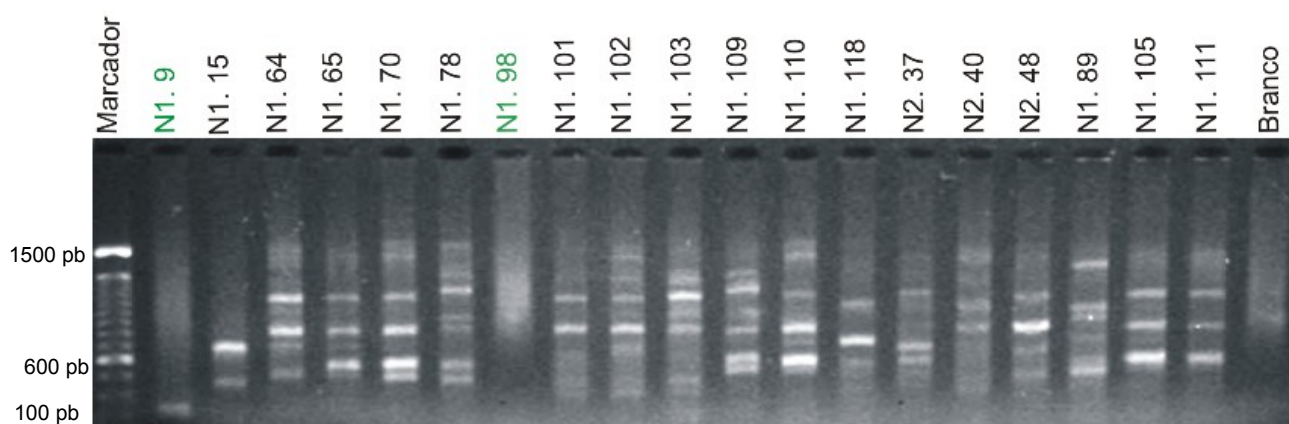
TABELA 2 – PORCENTAGENS DE RESULTADOS POSITIVOS PARA OS TESTES BIOQUÍMICOS

| | | |
|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Catalase | Urease | Fermentação |
| 100% | 8% | 36% |
| Nitrato | Fixação N | Dextrose |
| 81% | 2% | 96% |
| Frutose | Galactose | Lactose |
| 96% | 95% | 92% |
| Malato | Manitol | Sacarose |
| 94% | 95% | 95% |
| Amoxicilina 50 µg/mL | Amoxicilina 150 µg/mL | Amoxicilina 300 µg/mL |
| 80% | 84% | 80% |
| Tetraciclina 50 µg/mL | Tetraciclina 150 µg/mL | Tetraciclina 300 µg/mL |
| 13% | 3% | 6% |

5.4 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

5.4.1 BOX-PCR

Após a extração do DNA das 217 amostras da coleção básica 131 apresentaram DNA acima de 1 ng/μL e foram utilizadas para amplificação por BOX-PCR. Destas amostras, 93 apresentaram bom perfil de amplificação por BOX-PCR, conforme exemplificado na FIGURA 15.



FONTE: A autora (2009)

FIGURA 15 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE 17 ISOLADOS BACTERIANOS AMPLIFICADOS POR BOX-PCR

Gel de agarose 1,5%. Marcador DNA Ladder 100pb LUDWIG BIOTEC. Coloração com GelRed™

5.4.2 Sequenciamento

A diversidade pode ser identificada pelos dados do sequenciamento da região entre aproximadamente 770 e 1540 pares de base do gene 16S, a qual revelou em 35 dos 98 isolados, a presença de quatro gêneros já descritos como endofíticos promotores de crescimento e alguns potenciais fixadores de nitrogênio: *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Bacillus* e *Pantoea* (QUADRO 4). Os gêneros encontrados nos diferentes genótipos estão representados na FIGURA 16.

QUADRO 4 – IDENTIFICAÇÃO DE 35 ISOLADOS A PARTIR DA SEQUENCIA PARCIAL DO GENE 16S DO rRNA

| Isolado | Nº de bases | % de similaridade | Gênero | Nº acesso |
|---------|-------------|-------------------|------------------------|-------------|
| L1.103 | 569 | 100% | <i>Bacillus</i> sp | AB453296.1 |
| L1.110 | 574 | 100% | <i>Bacillus</i> sp | AB453296.1 |
| L1.87 | 521 | 100% | <i>Bacillus</i> sp | AB453296.1 |
| L1.88 | 510 | 100% | <i>Bacillus</i> sp | AB453296.1 |
| L1.98 | 583 | 100% | <i>Bacillus</i> sp | AB453296.1 |
| L2.25 | 574 | 100% | <i>Bacillus</i> sp | AB453296.1 |
| L2.07 | 574 | 100% | <i>Bacillus</i> sp | AB453296.1 |
| L2.08 | 572 | 100% | <i>Bacillus</i> sp | AF394538.1 |
| N1.113 | 563 | 99% | <i>Bacillus</i> sp | AB453296.1 |
| J1.61 | 565 | 100% | <i>Burkholderia</i> sp | GQ 246182.1 |
| J1.70 | 535 | 99% | <i>Burkholderia</i> sp | GQ 246182.1 |
| L1.C | 560 | 100% | <i>Burkholderia</i> sp | GQ 246182.1 |
| L2.15 | 561 | 99% | <i>Burkholderia</i> sp | GQ 246182.1 |
| N1.82 | 627 | 99% | <i>Burkholderia</i> sp | GQ 246182.1 |
| N1.90 | 556 | 100% | <i>Burkholderia</i> sp | GQ 246182.1 |
| L1.111 | 582 | 100% | <i>Klebsiela</i> sp | GU290319.1 |
| J1.59 | 588 | 100% | <i>Pantoea</i> sp | AF394538.1 |
| J1.60 | 507 | 99% | <i>Pantoea</i> sp | AF394538.1 |
| J1.68 | 615 | 99% | <i>Pantoea</i> sp | AF394538.1 |
| L1.102 | 536 | 99% | <i>Pantoea</i> sp | AF394538.1 |
| L1.115 | 539 | 100% | <i>Pantoea</i> sp | AF394538.1 |
| L1.23 | 565 | 99% | <i>Pantoea</i> sp | AF394538.1 |
| L1.04 | 528 | 99% | <i>Pantoea</i> sp | AF394538.1 |
| L2.11 | 548 | 99% | <i>Pantoea</i> sp | AF394538.1 |
| L2.14 | 545 | 100% | <i>Pantoea</i> sp | AF394538.1 |
| L2.19 | 585 | 100% | <i>Pantoea</i> sp | AF394538.1 |
| N1.102 | 623 | 100% | <i>Pantoea</i> sp | AB453296.1 |
| N1.116 | 512 | 100% | <i>Pantoea</i> sp | AF394538.1 |
| N1.06 | 558 | 100% | <i>Pantoea</i> sp | AF394538.1 |
| N1.96 | 580 | 100% | <i>Pantoea</i> sp | AF394538.1 |
| N2.20 | 576 | 99% | <i>Pantoea</i> sp | AF394538.1 |
| N2.32 | 548 | 99% | <i>Pantoea</i> sp | AF394538.1 |
| N2.40 | 590 | 100% | <i>Pantoea</i> sp | AF394538.1 |
| N2.45 | 578 | 100% | <i>Pantoea</i> sp | AF394538.1 |
| N2.07 | 578 | 100% | <i>Pantoea</i> sp | AF394538.1 |

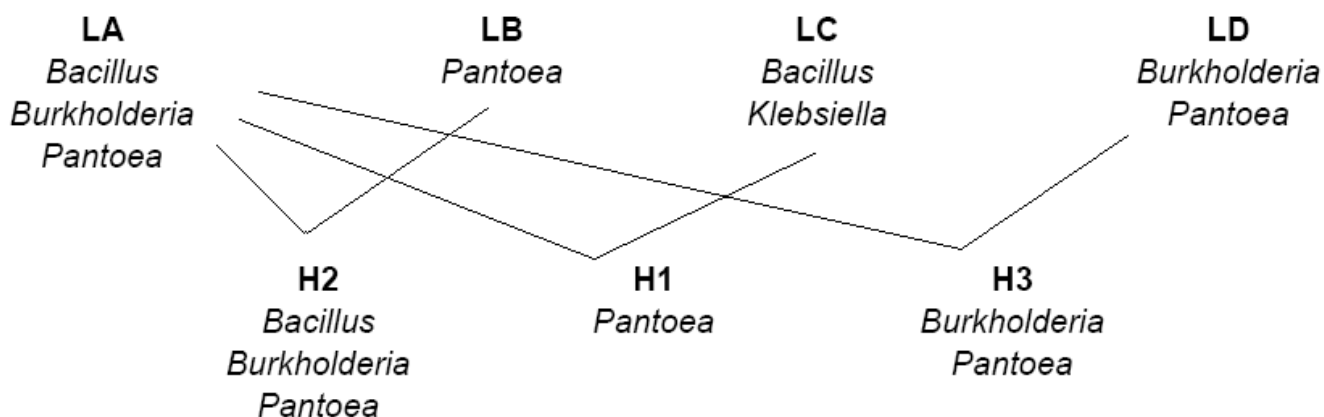


FIGURA 16 – GÊNEROS IDENTIFICADOS EM CADA GENÓTIPO POR MEIO DE SEQUENCIAMENTO PARCIAL DA REGIÃO 16S

Parentais: LA (linhagem A); LB (linhagem B); LC (linhagem C); LD (linhagem D). **Híbridos:** H2 (híbrido de LA x LB); H1 (híbrido de LA x LC); H3 (híbrido de LA x LD)

5.5 ANÁLISE DE DADOS

Todos os dados obtidos pelas análises morfofisiológica e molecular foram analisados separadamente pelo programa NTSYS gerando os dendrogramas das FIGURAS 17 a 23 cujos valores à esquerda dos nós representam “bootstrap” significativo (acima de 50%). As análises foram realizadas individualmente tanto para as linhagens como para cada híbrido avaliado.

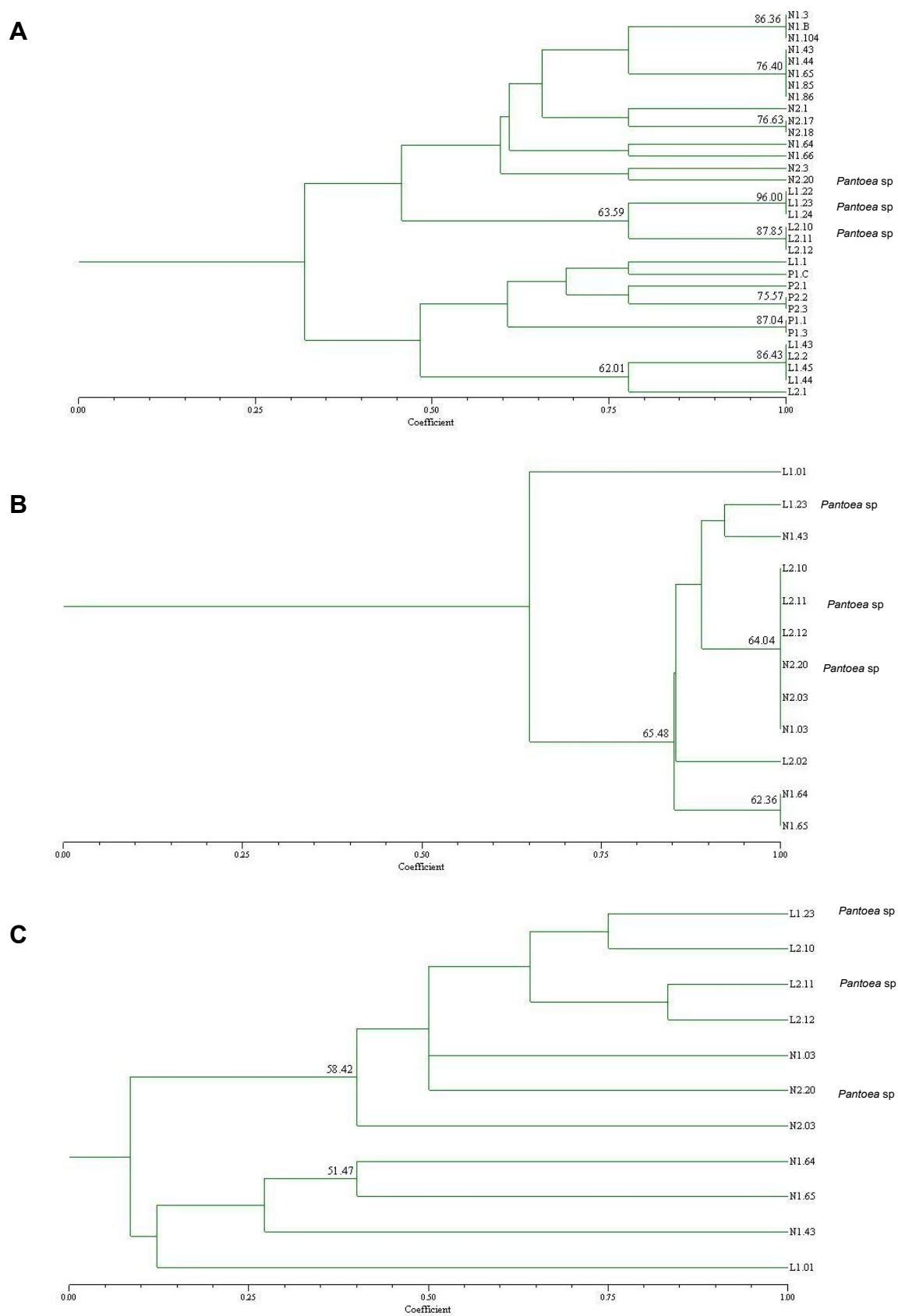


FIGURA 17 – DENDROGRAMAS DAS CARACTERÍSTICAS A) MORFOLÓGICAS B) BIOQUÍMICAS C) MOLECULAR (BOX-PCR) DE ISOLADOS DO HÍBRIDO 1 (LA x LC)

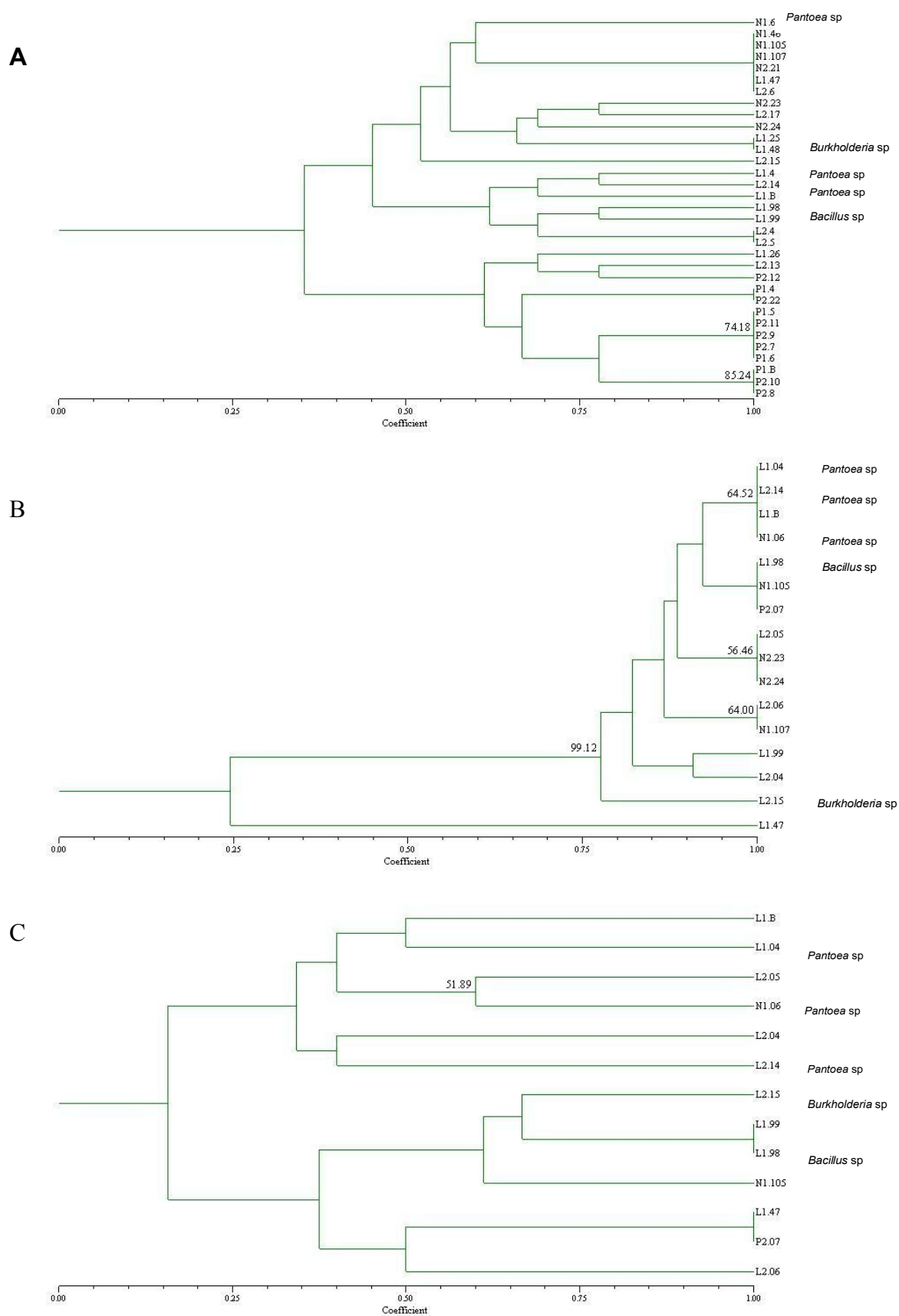


FIGURA 18 – DENDROGRAMAS DAS CARACTERÍSTICAS A) MORFOLÓGICAS B) BIOQUÍMICAS C) MOLECULAR (BOX-PCR) DE ISOLADOS DO HÍBRIDO 2 (LA x LB)

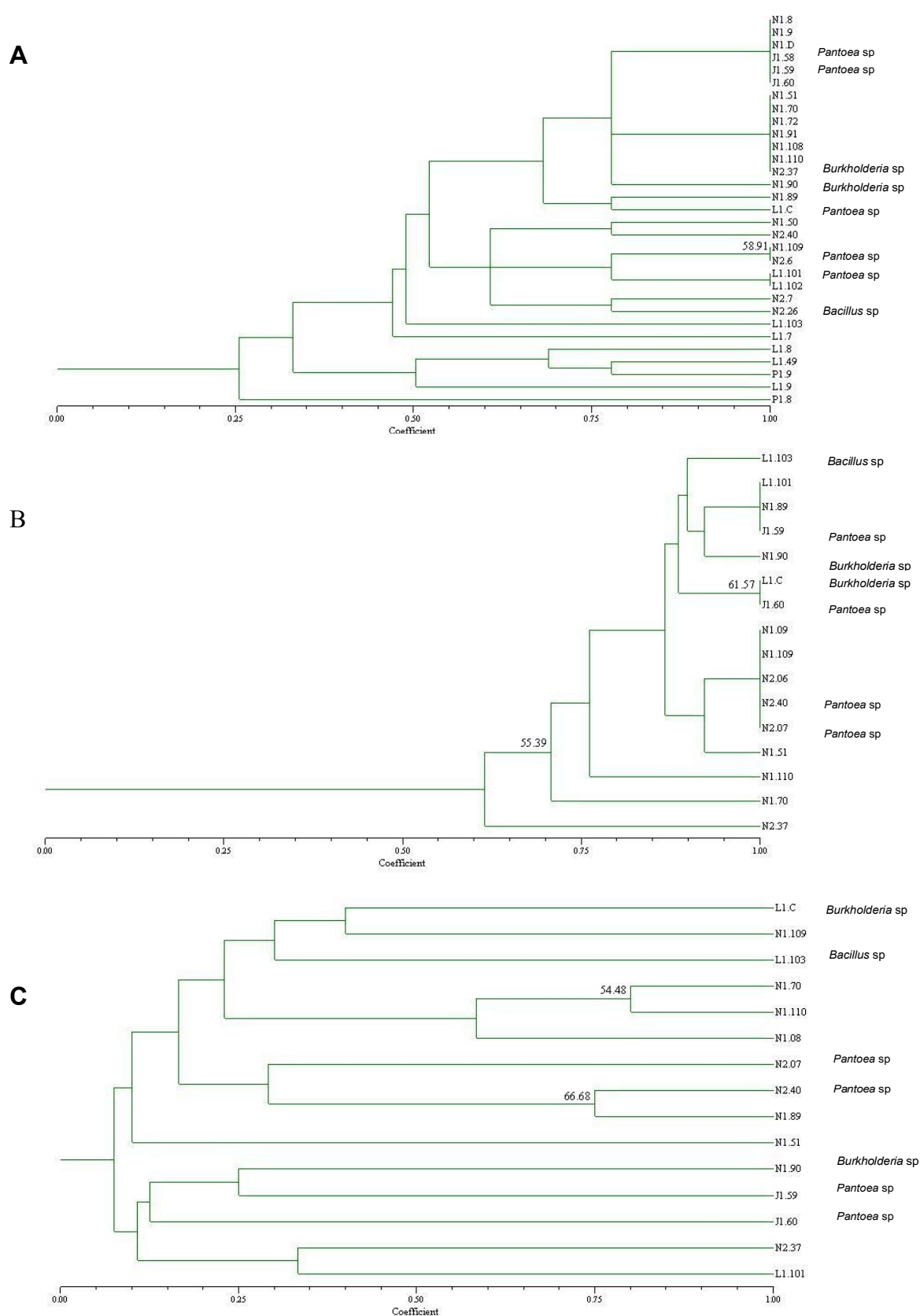


FIGURA 19 – DENDROGRAMAS DAS CARACTERÍSTICAS A) MORFOLÓGICAS B) BIOQUÍMICAS C) MOLECULAR (BOX-PCR) DE ISOLADOS DO HÍBRIDO 3 (LA x LD)

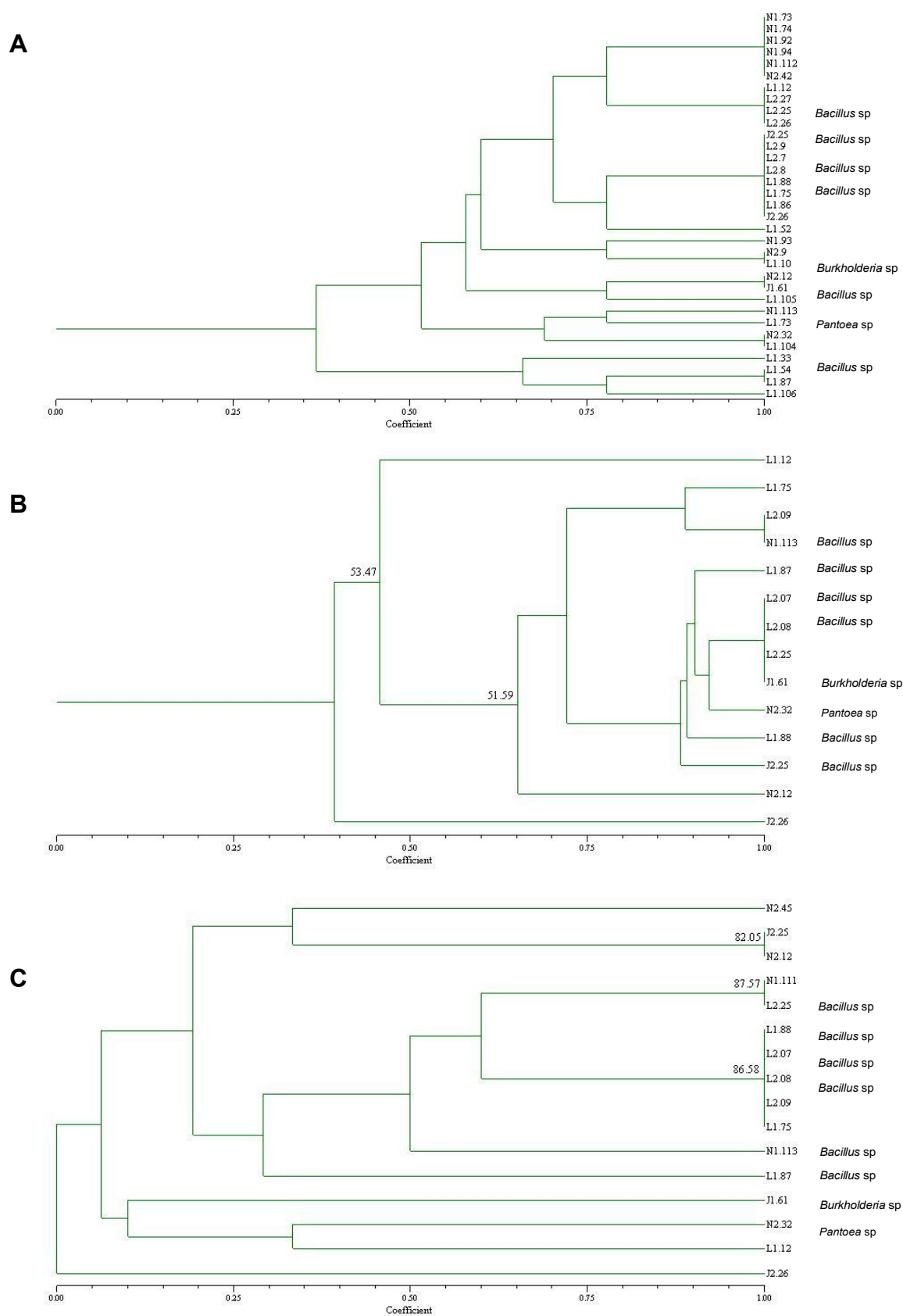


FIGURA 20 – DENDROGRAMAS DAS CARACTERÍSTICAS A) MORFOLÓGICAS B) BIOQUÍMICAS C) MOLECULAR (BOX-PCR) DE ISOLADOS DA LINHAGEM A

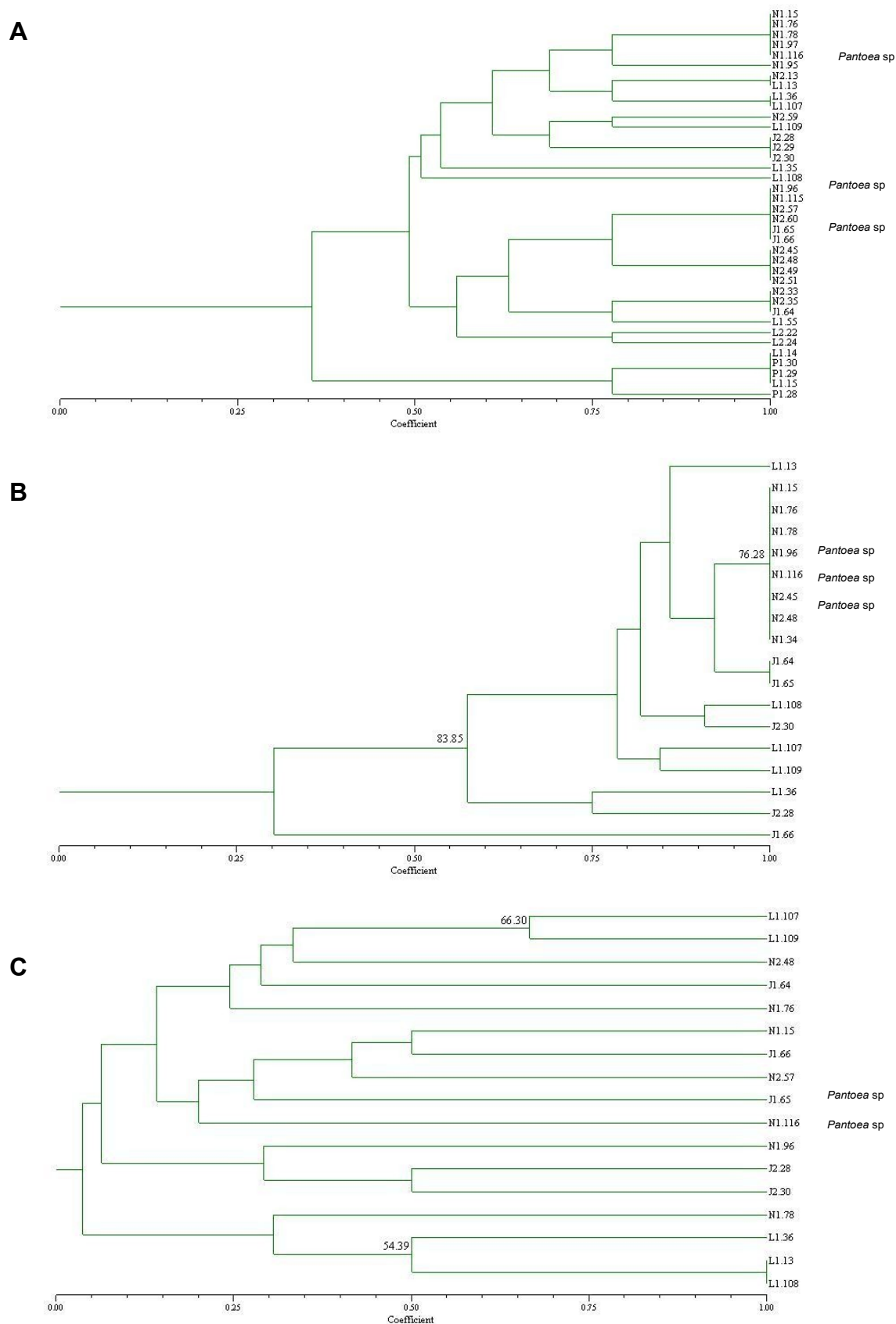


FIGURA 21 – DENDROGRAMAS DAS CARACTERÍSTICAS A) MORFOLÓGICAS B) BIOQUÍMICAS C) MOLECULAR (BOX-PCR) DE ISOLADOS DA LINHAGEM B

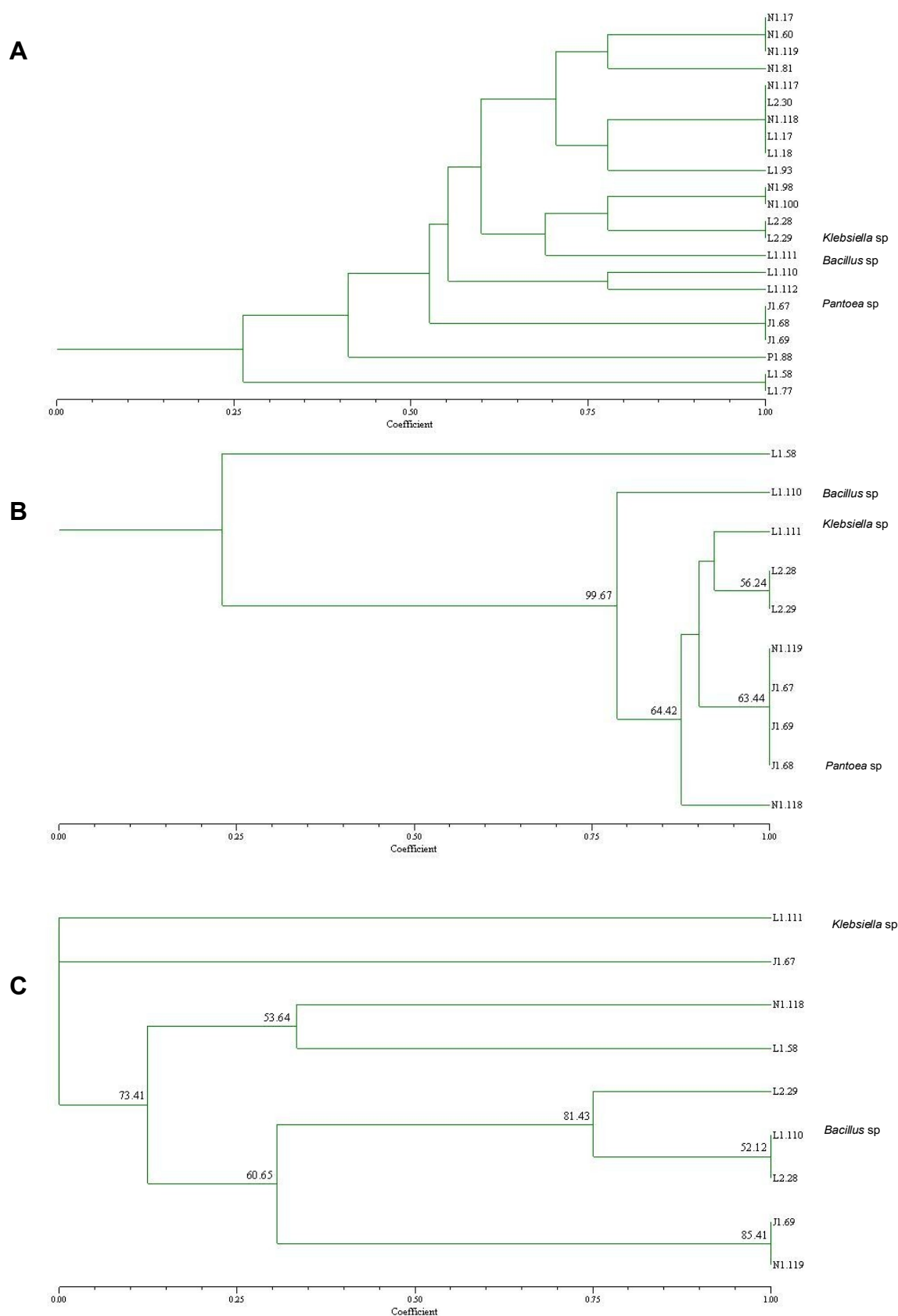


FIGURA 22 – DENDROGRAMAS DAS CARACTERÍSTICAS A) MORFOLÓGICAS B) BIOQUÍMICAS C) MOLECULAR (BOX-PCR) DE ISOLADOS DA LINHAGEM C

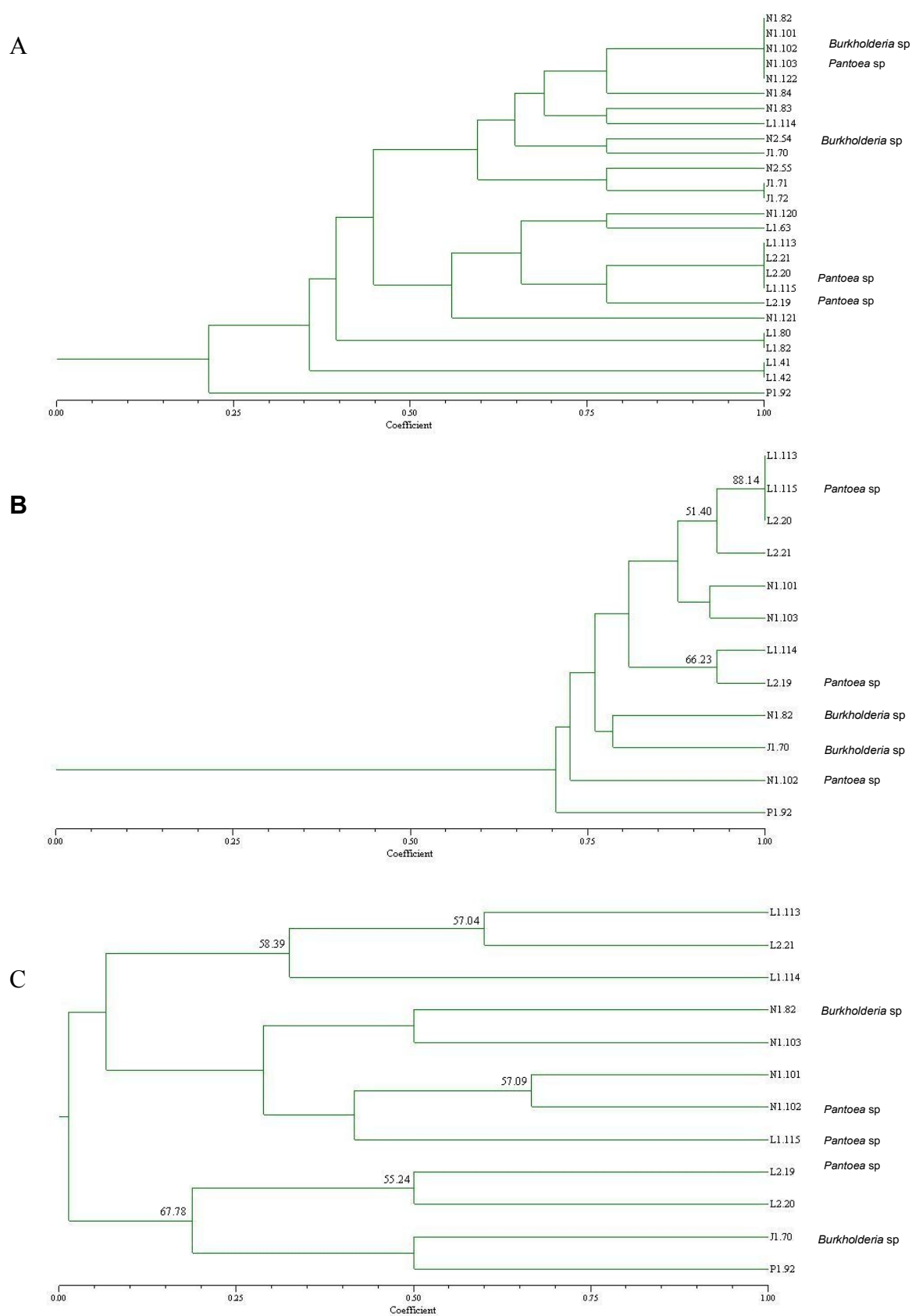


FIGURA 23 – DENDROGRAMAS DAS CARACTERÍSTICAS A) MORFOLÓGICAS B) BIOQUÍMICAS C) MOLECULAR (BOX-PCR) DE ISOLADOS DA LINHAGEM D

6 DISCUSSÃO

Os resultados preliminares da morfologia bacteriana, Teste de Gram e análises bioquímicas já sinalizaram a presença de diversidade na coleção estabelecida de bactérias endofíticas presentes na raiz de sete genótipos de milho.

Com a construção dos dendrogramas foi possível confirmar a alta diversidade morfofisiológica e genética presente em todas as amostras, independentemente dos genótipos vegetais dos quais as bactérias foram originadas. Um dos fatores que parece estar associado à possibilidade de manifestação de alta variabilidade é a presença de alto índice de matéria orgânica expresso pela altíssima capacidade de troca de cátions (CTC igual a $270,3 \text{ mmolc/dm}^3$). Em solo de cerrados este valor encontra-se na faixa de 2 a 4 mmolc/dm^3 . Em contrapartida, neste mesmo solo existe um elevado índice de alumínio ($21,5 \text{ mmolc/dm}^3$) e baixo pH (4,4) (TERASAWA JUNIOR, comunicação pessoal). Estes dois fatores são limitantes ao crescimento bacteriano. Pode-se considerar que mesmo com a alta diversidade presente no solo, o alto teor de alumínio e o baixo pH não corrigidos para este estudo, são seletivos para as bactérias capazes de sobreviver a estas condições adversas. É importante a investigação da ação interativa funcional destes isolados com a planta, visando o benefício potencial para variedades recomendadas para regiões limítrofes de cultivo de milho. Neste mesmo solo da Semília Genética e Melhoramento Ltda., Oliveira *et al.* (2010) observaram em estudos de diversidade, alta magnitude de variação encontrada em rizóbios que nodulam feijoeiro, provavelmente associada a estas mesmas características.

A metodologia adotada neste estudo indicou que alguns parâmetros estimados não foram capazes de discriminar os isolados da coleção estabelecida. Estes incluem: coloração de colônias, tamanho da colônia e alguns testes bioquímicos como da catalase e crescimento intrínseco em fontes de carbono.

A coloração das colônias não pode ser discriminada quando crescidas sem o corante Rosa de Bengala, usado como fungicida. Ainda, o tamanho da colônia varia em função da fase de crescimento bacteriano. Assim mesmo, todos os dendrogramas de morfologia que contemplam as demais características avaliadas, expressam os maiores índices de variabilidade até porque compreendem maior número de isolados (217) que os testes bioquímicos (98).

O teste da catalase não foi relevante neste estudo, uma vez que resultou na totalidade de amostras positivas. Isto ocorre porque algumas reações bioquímicas podem ser comuns a maioria das bactérias, não apresentando assim, capacidade discriminatória. Rezende, Oliveira e Didonet (2009) descrevem que o teste de catalase com resultado positivo é um dos requisitos para a identificação do gênero *Pseudomonas*, fixadora de nitrogênio, mas destacam que são necessários outros testes moleculares para confirmação da classificação por resultados enzimáticos.

Os dados de crescimento intrínseco em diferentes fontes de carbono também sugerem que a maioria dos isolados não é seletiva para fontes específicas de carbono no seu crescimento. Para o teste de tolerância intrínseca em antibiótico, os resultados mostram ser a tetraciclina o antibiótico mais eficiente para inibição do crescimento destas bactérias. Dentre as diferentes concentrações, pode-se observar que as porcentagens de inibição do crescimento foram muito próximas (TABELA 2).

O teste de nitrato indicou 81% de respostas positivas, sendo este um teste indicativo da possibilidade de fixação biológica de nitrogênio. Já o teste de urease apontou apenas 8% de bactérias potencialmente fixadoras e este dado contrasta com os 2% (dois isolados) de resposta positiva para o teste de fixação de nitrogênio (TABELA 2). Este último teste pode ter seu resultado atribuído ao tempo de crescimento avaliado, pois está associado ao melhor período da atividade fixadora. Mesmo assim, o teste de fixação do N_2 foi fundamental para uma prévia identificação de possíveis grupos fixadores, uma vez que apenas os isolados L1.23 e L1.24 apresentaram atividade da nitrogenase. Estes isolados na análise morfológica agruparam-se com outro isolado, o L1.22 (78% de similaridade), o que pode indicar que ele pertença ao mesmo grupo (FIGURA 17), necessitando de análise comprobatória.

A formação deste grupo é melhor visualizada na FIGURA 24A que representa a análise de componentes principais da matriz de similaridade morfológica. Como os isolados L1.24 e L1.23 são fixadores de nitrogênio, a formação deste grupo pode sugerir que talvez todos estes isolados também sejam potenciais fixadores de nitrogênio. Apenas o isolado L1.23 foi submetido aos outros testes bioquímicos e à análise molecular, devido à baixa sobrevivência das bactérias em condições de laboratório. Na análise bioquímica, o isolado fixador L1.23 aparece próximo ao N1.43 e na análise molecular, agrupado aos isolados L2.10, L2.11, L2.12, N1.03, N2.20 e N2.03.

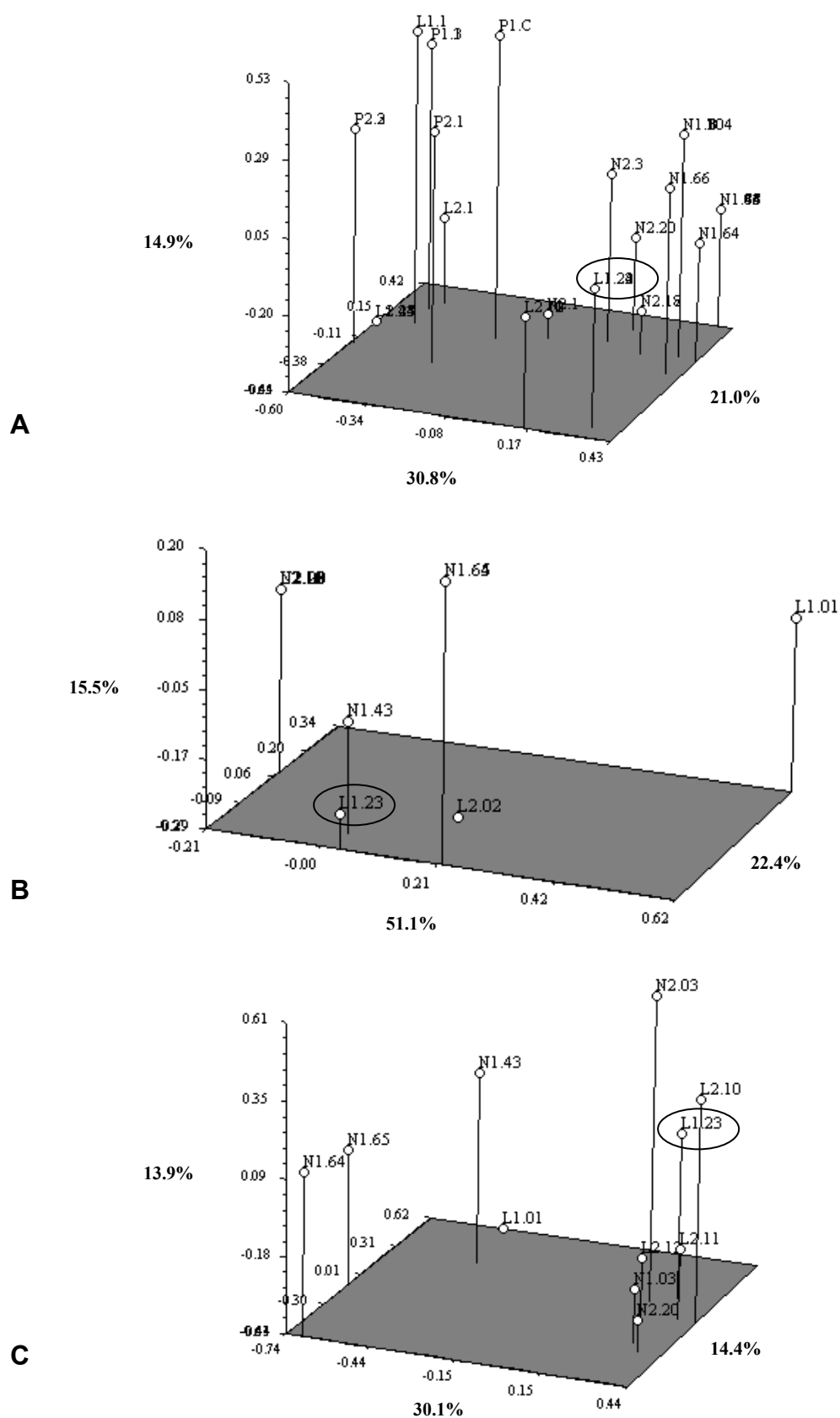


FIGURA 24 – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS CARACTERIZAÇÕES A) MORFOLÓGICA B) BIOQUÍMICA C) MOLECULAR (BOX-PCR) DE ISOLADOS DO GENÓTIPO 1 (HÍBRIDO DE LA x LC)

Isto pode indicar que estas amostras também tenham características de fixadoras de nitrogênio, mas que não foram evidenciadas no teste de atividade da nitrogenase devido ao período de crescimento intrínseco a cada isolado. Neste caso, novos testes podem esclarecer esta possibilidade, pois inúmeros trabalhos como os de Boddey e Döbereiner (1995), Baldani *et al.* (1997), Reinhold-Hurek e Hurek (1998), Cavallet *et al.* (2000), Perin; Baldani e Reis (2004), Roesh *et al.* (2005), Didonet (2007) entre outros, relatam o papel de bactérias endofíticas com potencial de fixação de nitrogênio e sua relação com a promoção do crescimento vegetal, visando benefícios econômico e ambiental na área agrícola. É importante salientar que grupos de endofíticos fixadores de nitrogênio podem estar associados à maior eficiência na promoção de crescimento vegetal e portanto, torna-se possível a identificação de potenciais isolados para o desenvolvimento de inoculantes comerciais.

A baixa disponibilidade de nitrogênio no solo pode permitir a seleção de isolados que incrementam o rendimento da cultura. Cavallet *et al.* (2000) pesquisaram o efeito da bactéria fixadora de nitrogênio *Azospirillum* spp. inoculada em plantas de milho e observaram que este gênero além da FBN, também promove o aumento radicular com possíveis efeitos na produção de substâncias promotoras de crescimento. Weber, Baldani e Döbereiner (2000) observaram que mudas de bananeira inoculadas por diazotróficas dos tipos *Herbaspirillum* e *Burkholderia* apresentaram crescimento significativo em mudas da planta. O benefício de bactérias endofíticas para produção de inoculantes já tem sido demonstrada em diversos estudos (CAMPOS, THEISEN, GNATTA, 2000; EMPRAPA, 2007; HUNGRIA *et al.*, 2009). Quando identificada a contribuição de isolados de bactérias endofíticas no efeito de absorção de nutrientes, há a perspectiva de serem conduzidos testes para avaliar a característica de fixação e sua relação com a produtividade, uma vez que trabalhos relatam o benefício do uso de inoculantes para gramíneas, em especial o milho.

Ainda, Pereira *et al.* (2007), observaram que a técnica de BOX-PCR foi capaz de detectar a diversidade genética elevada de rizóbios isolados de plantas de soja, com agrupamento de estirpes em baixo nível de similaridade. A diversidade detectada pelos autores foi importante para relacionar a presença de eficiência de fixação do nitrogênio com a presença de maior número de espécies em rotação de cultura. Foi observado que com a presença do hospedeiro específico (soja) na

maioria das vezes, houve menor diversidade, o que indica uma possível seleção de estirpes mais eficientes no fornecimento de nitrogênio via FBN. Os autores destacam ainda, que a diversidade de microrganismos específicos pode ser oposta à funcionalidade, pois ocorre um aumento da pressão de seleção, mas que é preciso considerar as interações microbianas dos sistemas agrícolas.

Após o sequenciamento e identificação dos isolados nos dendrogramas gerados pela análise BOX-PCR, foi observado que esta técnica mostrou-se altamente eficiente para a identificação de isolados ao nível de gênero. Por exemplo, na FIGURA 18 ao se comparar no híbrido 2 os dados da análise molecular e do sequenciamento parcial, o grupo identificado como *Pantoea* apresenta somente 35% de similaridade com outros isolados identificados como dos gêneros *Burkholderia* e *Bacillus*., revelando a baixa similaridade entre os agrupamentos. Isso também é observado na FIGURA 20, representativa da linhagem A, onde ocorreu um agrupamento indicando que os isolados do gênero *Bacillus* têm também apenas 35% de similaridade com outros isolados identificados como *Pantoea* e *Burkholderia*. Para esse mesmo genótipo, é possível salientar ainda que os agrupamentos formados na análise morfofisiológica confirmam os resultados encontrados na análise molecular.

Outros agrupamentos formados na análise de BOX-PCR sem identificação por meio de sequenciamento sugerem que existam outros gêneros distintos daqueles detectados no presente trabalho. Isso é evidenciado na FIGURA 21, onde apenas o gênero *Pantoea* é identificado e que, provavelmente, os outros agrupamentos sem identificação possam conter isolados de gêneros distintos daqueles detectados pelo sequenciamento parcial dessa região do 16S. Aparentemente, a capacidade de colonização do gênero *Pantoea* é mais proeminente do que os demais gêneros identificados.

Para as variáveis bioquímica, morfológica e molecular, não foi observada colonização diferencial entre genótipos (linhagens e híbridos). Entretanto, após a classificação dos isolados por meio de sequenciamento, observou-se na linhagem B (FIGURA 21), bem como no híbrido 1 (FIGURA 17), somente a presença do gênero *Pantoea*. Ainda, observou-se que a colonização ocorrida na linhagem C (FIGURA 22) foi somente pelos gêneros *Bacillus* e *Klebsiella*, sendo o último, presente apenas nessa linhagem. Entretanto, tais conclusões precisam ser vistas com cautela, pois

nem todos os isolados obtidos foram identificados por seqüenciamento até o momento, o que poderia modificar tais resultados.

O esquema de cruzamentos e classificação dos gêneros encontrados por meio de sequenciamento representado na FIGURA 16 indicou que das quatro linhagens estudadas, a linhagem A (FIGURA 17) foi a que apresentou maior diversidade de gêneros colonizando suas raízes. A expressão dessa capacidade foi observada apenas no híbrido 2 (FIGURA 18), que foi colonizado pelos mesmos gêneros desta linhagem. Na linhagem B (FIGURA 21) houve expressão de isolados somente do gênero *Pantoea*, mas seu híbrido 2 (FIGURA 18) proveniente do cruzamento com a linhagem A (FIGURA 20), apresenta o padrão de colonização similar a esta linhagem. Comportamento semelhante foi verificado nos híbridos provenientes dos cruzamentos entre LA x LC (híbrido 1, FIGURA 17) e LA x LD (híbrido 3, FIGURA 19) que mantém esta mesma tendência.

Outro aspecto que pode ser evidenciado neste trabalho foi a colonização múltipla das raízes das plantas. Isso fica evidente na FIGURA 23 (Linhagem D) onde os isolados L1.113 e L1.115 aparecem em diferentes grupos no dendrograma obtido com os dados de BOX-PCR. Tais isolados foram obtidos a partir da mesma raiz da planta. O mesmo pode ser observado para os isolados L2.19 e L2.21 na FIGURA 23. Outros exemplos podem ser observados na FIGURA 21 com os isolados L1.107 e L1.108 e FIGURA 22 com os isolados N1.118 e N1.119. Este é um dado extremamente importante, pois revela que além das plantas de milho investigadas abrigarem bactérias endofíticas com grande variabilidade genética, ainda demonstra que tal diversidade de colonização pode ocorrer dentro da mesma raiz. É importante destacar que esta colonização múltipla não parece ser influenciada pelo genótipo da planta investigada.

Os quatro gêneros identificados pelo sequenciamento parcial do 16S, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Burkholderia* e *Pantoea*, já foram relatados como promotores de crescimento, sendo os três últimos também capazes de fixar nitrogênio. Os dois isolados caracterizados como fixadores de nitrogênio pelo teste de atividade da nitrogenase (L1.23 e L1.24), foram identificados como pertencentes ao gênero *Pantoea*. Com experimento em casa de vegetação usando plantas de bananeira, Weber, Baldani e Döbereiner (2000) demonstraram que houve ganho no crescimento vegetal provavelmente pela produção de substâncias fitorreguladoras produzidas pelas diazotróficas. Bevivino *et al.* (1994) observaram que a bactéria

fixadora de nitrogênio do gênero *Burkholderia* além de promover crescimento vegetal pode estar relacionada à capacidade de controle do crescimento de fungos fitopatogênicos.

Ferreira *et al.* (2008) relataram que a bactéria *Pantoea agglomerans* pode estar relacionada à promoção de crescimento vegetal, sendo que a presença desses endófitos oferece proteção das sementes contra doenças e herbívoros. Nesse estudo foi observada a colonização de endófitos *P. agglomerans* geneticamente modificados em plantas de eucalipto e os resultados sugerem que a transferência de endófitos pelas sementes pode manter a estabilidade da comunidade bacteriana e os benefícios transmitidos à descendência da planta.

Procópio *et al.* (2009), constataram que o sequenciamento do gene 16S rRNA discriminou bactérias endofíticas de eucalipto e revelou alto nível de polimorfismo genético entre os isolados com relação positiva entre “clusters” e origem geográfica. Também foi testada a interação de bactérias identificadas como *Pantoea* e *Burkholderia cepacia* quanto à secreção de metabólitos com efeito inibitório em fungos endofíticos, sugerindo uma ação antagonista desses microrganismos na planta hospedeira. Destaca-se assim, a importância de estudos para o controle de doenças e promoção do crescimento vegetal a partir da seleção de bactérias endofíticas isolada de plantas.

Na busca do grau de colonização bacteriana entre genótipos de milho, observou-se no presente estudo que a composição homozigota das linhagens não diferencia do comportamento verificado nos híbridos por elas produzidos. As FIGURAS 17 e 22 demonstram tais resultados, pois contém os isolados endofíticos provenientes do híbrido 2 e da linhagem D. Também não foi observada colonização diferencial entre híbridos como o apresentado na FIGURA 18 (híbrido 2) e seus respectivos parentais nas FIGURAS 19 (linhagem A) e 20 (linhagem B). Isso pode indicar que a mesma seleção que ocorre em linhagens é igualmente transmitida para o híbrido sem que o efeito de heterose interfira na presença de grupos bacterianos endofíticos do sistema radicular. Assim, é possível concluir que a composição genotípica das plantas não influencia a colonização em termos de magnitude da variabilidade genética dos seus isolados. Este comportamento é reafirmado em todas as demais figuras representativas dos genótipos avaliados individualmente (FIGURAS 16, 17, 21 e 22).

Os dados encontrados no presente estudo contrastam com os resultados obtidos por Rodrigues *et al.* (2006), ao observarem que a colonização por diazotróficas endofíticas em diferentes genótipos de arroz está relacionada ao estágio de desenvolvimento da planta e que é possível identificar diferenças de colonização em genótipos distintos, sendo que em linhagens a diversidade apresenta-se menor do que nas variedades geneticamente melhoradas. Isso indica um processo de seleção de indivíduos relacionado ao genótipo que permite a interação da planta com bactérias específicas. Mesmo não tendo sido realizado uma avaliação em vários estágios de crescimento do milho, o comportamento genotípico não correspondeu aos dados do trabalho acima citado.

É importante ressaltar que os dados obtidos quanto à comparação de colonização entre genótipos homozigotos não possui grande suporte na literatura uma vez que, a análise de linhagens usualmente não é possível pela falta de acesso às matrizes que compõem os pares heteróticos dos híbridos comerciais de empresas de melhoramento. Os resultados aqui expostos representam um dado importante de avaliação genotípica e futuros estudos sobre promoção de crescimento vegetal usando os isolados aqui identificados como perspectivas de continuidade deste trabalho.

7 CONCLUSÃO

Foi estabelecida uma coleção de bactérias endofíticas de raízes de diferentes genótipos de milho (*Zea mays* L.), sendo que caracterizações morfofisiológica e genética revelaram variabilidade.

Apesar da grande variabilidade entre os isolados, não foi observada colonização diferencial entre os diferentes genótipos, sejam eles linhagens homozigotas ou híbridos comerciais. Por outro lado ficou evidenciada colonização múltipla por raiz, mas sem aparente influência do genótipo da planta. A técnica de BOX-PCR foi eficiente na caracterização dos isolados e a técnica de sequenciamento revelou a presença dos gêneros *Pantoea*, *Bacillus*, *Burkholderia* e *Klebsiella* que caracterizam os isolados como bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio e prováveis promotoras de crescimento vegetal.

8 PERSPECTIVAS

O presente trabalho gera grandes perspectivas de continuidade, especialmente para a avaliação do potencial de absorção de água, nutrientes, promoção do crescimento e fixação de nitrogênio visando a produção de inoculantes comerciais.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4ª Ed. Editora Artmed, 2004, 1463p.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p.3389-3402, 1997.

AMANN, R.L.; LUDWIG, W.; ACHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews**, Washington, v.59, p.143-169, 1995.

ARAÚJO, W.L. de; LIMA, A.O. de S.; AZEVEDO, J.L de; MARCON J.; SOBRAL, J.K.; LACAVA, P.T. **Manual**: isolamento de microrganismos endofíticos. Piracicaba: CALQ, 2002.

ASSUMPÇÃO, L. C.; LACAVA, P.T.; DIAS, A.C.F.; AZEVEDO, J.L.; MENTEN, J.O.M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de semente de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.5, p.503-510, 2009.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology & Biochemistry**, Seropédica, n.5/6, v.29, p.911-922, 1997.

BALDANI, J.I.; OLIVEIRA, L.M.; GUIMARÃES, S.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS Jr, F.B.; SILVA, L.G.; REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation (BNF) in non-leguminous plants: the role of endophytic diazotrophs. **Embrapa Agrobiologia**, Seropédica, p.397-4000, 2000.

BÁRBARO, I.M; BRANCALÃO, S.R.; TICELLI, M. **É possível a fixação biológica de nitrogênio no milho?**. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2008_2/fixacao/index.htm. Acesso em: Ago/2008.

BARRETTI, P.B.; SOUZA, R. M. de; POZZA, E. A. Bactérias endofíticas como agentes promotores do crescimento de plantas de tomateiro e de inibição *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.3, p.731-739, 2008.

BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L.; CARUSI, M.V.; DEL-GALLO, M.; VISCA, P. Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacia*. **Microbiology**, Grã-Bretanha, v.140, p.1069-1077, 1994.

BOBATO, A. **Índice nutricional do nitrogênio: uma ferramenta para o diagnóstico do estado nutricional da cultura do milho**. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1884/7482>. Acesso em: Ago/2008.

BODDEY, R.M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. **Fertilizer Research**, Oxford, v.42, p.241-250, 1995.

BURDMAN, S.; KIGEL, J.; OKON, Y. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vilgaris* L.). **Soil Biology & Biochemistry**, Rehovot, v.29, n.5/6, p.923-929, Jul 1997.

CAMPOS, B. C.; THEISEN, S.; GNATTA, V. Avaliação do inoculante “Graminante” na cultura de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.4, p.713-715, 2000.

CASSINI, S.T. **Ciclo do nitrogênio**. Disponível em: http://www.inf.ufes.br/~neyval/Gestao_ambiental/Tecnologias_Ambientais2005/Ecologia/CicloNPS.doc. Acesso em: Ago/2008.

CAVALLET, L.H.; PESSOA, A.C. dos S.; HELMICH, J.J.; HELMICH, P.R.; OST, C.F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.4, n.1, p.129-132, 2000.

Centro de Inteligência do Milho (CIMilho). **Lavouras de milho do Paraná têm boas condições de desenvolvimento na safra 2009/2010**. Disponível em: <http://cimilho.cnpms.embrapa.br/inicio/index.php>. Acesso em Dez/2009.

CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E. V.; MOSTASSO, F. L.; CAMPO, R. J.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v.27, n.5, p.833-840, 2003.

COELHO, A.S.G. **BOOD v3.03: Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap**. Goiânia: UFG, 2000.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira - grãos: décimo primeiro levantamento**, Agosto de 2009. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: Ago/2009.

CRUZ, J.C. (Ed.). **Cultivo do milho**. 3. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2007. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistemas de produção). Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_3ed/autores.htm. Acesso em: Ago/2008.

DI CELLO, F.; BEVIVINO, A. CHIARINI, L.; FANI, R.; PAFFETTI, D.; TABACCHIONI, S.; DALMASTRI, C. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. **Applied and Environmental Microbiology**, Florence, v.63, n.11, p.4485-4493, Aug 1997.

DIDONET, C.C.G.M. **Bactérias diazotróficas: isolamento, diversidade e caracterização em plantas do arroz no cerrado**. Anápolis: UnU CET, 2007. 20 p.

DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and nitrogen-fixing sites, 1976.

DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A.P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**, Lisboa, v.1, p.261-272, 1958.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. **Embrapa-SPI. Itaguaí, Embrapa-CNPAB**, Brasília, 1995.

DÖBEREINER, J. ANDRADE, V. de O.; BALDANI, V.L.D. **Protocolos para preparo de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999.

DUARTE, J. de O. **Economia da produção**. In: CRUZ, J.C. (Ed.). Cultivo do milho. 3. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2007. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_3ed/economia.htm. Acesso em: Ago/2008.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **EMBRAPA MILHO E SORGO**, 2008. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br>. Acesso em: Ago/2008.

FERNANDES, G.C.; SOUZA, J.A.M.; CAMPANHARO, J.C. **Uso da técnica de BOX-PCR na caracterização molecular de isolados rizosféricos de plantas de milho**. Disponível em: <http://web2.sbg.org.br/congress/sbg2008/pdfs2009/GM014-28767.pdf>. Acesso em: Dez/2009.

FERREIRA, A.; QUECINE, M.C.; LACAVA, P.T.; ODA, S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Monitoramento e Colonização da Bactéria Endofítica e Geneticamente Modificada *Pantoea agglomerans* em Mudanças de *Eucalyptus*. **Holos Environment**, v.8, n.2, 2008. Suplemento 1 - III Workshop de Ecotoxicologia. Resumo.

GURTLER, V.; STANISH, V.A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. **Microbiology (Reading)**, v.142, p.3-16, 1996.

HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**, (2001). Disponível em: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914, 1997.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil (online)**, 2009.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CAMPO, R.J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean grown under the no-tillage and conventional systems in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, v.32, n.2, p.210-220, 2006.

KIM, W.; HONG, Y.; YOO, J.; LEE, W.; CHOI, C.; CHUNG, S. Genetic relationship of *Bacillus anthracis* and closely related species based on variable-number tandem repeat analysis and BOX-PCR genomic fingerprinting. **FEMS Microbiology Letters**, v.207, p.21-27, 2001.

LACAVA, P.T.; ANDREOTE, F. D.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR específico e DGGE. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.4, p.637-642, 2006.

MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasiliense* mutants resistant to ethlenediamine. **Canadian Journal of Microbiology**, v.37, p.549-553, 1991.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 9. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2000.

MATSON, P. A.; NAYLOR, R.; MONASTEIRO, O. Integration of environmental, agronomic, and economic aspects of fertilizer management. **Science**, Washington, DC, v.280, n.3, 1998.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITZ, G. Isolation and identification of *Gluconacetobacter azotocaptans* from corn rhizosphere. **Systematic and Applied Microbiology**, Ontario, v.29, p.496–501, 2006.

NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION) **BLAST**. Disponível em : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Acesso em: Fev /2010.

NOGUEIRA, C.A.M.; MOMESSO, C.A.S.; MACHADO, R.L.D.; ALMEIDA, M.T.G. de; ROSSIT, A.R.B. Desempenho de kits comerciais e protocolos laboratoriais para a extração de DNA genômico bacteriano. **Revista Panamericana de Infectologia**, v.6, n.2, p.35-38, 2004.

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v.63, n.7, p.366-370, 1997.

OLIVEIRA, J.P.; GALLI-TERASAWA, L.V.; GLIENKE, C.; CORDEIRO, V.K.; ARMSTRONG, L.C.T.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of rhizobia in a Brazilian oxisol nodulating Mesoamerican and Andean genotypes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). (submetido).

OLSEN, G.J.; WOESE, C.R.; OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.176, p.1-12, 1994.

PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.M.; NEWTON, W. E. Interactions of diazotrophic *Azoarcus* spp. with rice. In: REINHOLD-HUREK, B. *et al.* Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Nitrogen Fixation: from molecules to crop productivity. Netherlands: **Kluwer Academics Publishers**, 2000. p.405-408.

PEDROSA, F.O.; YATES, M.G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasiliense* by *nifA* and *ntrC* (*ginG*) type genes. **FEMS Microbiology Letters**, v.55, p.95-101, 1984.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996.

PEREIRA, A.A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; KASCHUK, G.; CHUEIRE, L.M. de O.; CAMPO, R.J.; TORRES, E. Variações Qualitativas e quantitativas na microbiota do solo e na fixação biológica do nitrogênio sob diferentes manejos com soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p.1397-1412, 2007.

PERIN, L.; BALDANI, J.I.; REIS, V.M. Diversidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolada de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.8, p.763-770, 2004.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: FOKKEMA, N.J. HEUVEL, J. VAN DEN (Ed), **Microbiology of the phyllosphere**. Cambridge University Press, p.175-87, 1986.

PISA, G. **Identificação Molecular de bactérias de solo cultivado de Campo Belo so Sul (SC) capazes de nodular feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)** Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2008. Disponível em: <http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=25562>. Acesso em: Ago/2009.

PROCÓPIO, R.E.L.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI, Jr; AZEVEDO, J.L. Characterization of na endophitic bacterial community associated with *Eucapypthus* spp. **Genetics and Molecular Research**, v.8, n.4, p.1408-1422, 2009.

RAJU, P.N.; EVANS, H.J.; SEIDLER, R.J. An Asymbiotic Nitrogen-Fixing Bacterium from the Root Environment of Corn. **Proceedings of the National Academy of Science**, USA, v.69, n.11, p.3474-3478, 1972.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends in Microbiology**, Marburg, v.6, n.4, p.139-144, 1998.

REIS JUNIOR, F.B. dos; SILVA, L.G. da; REIS, V.M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.5, p.985-994, 2000.

REIS, V.M.; OLIVARES, F. L.; CRUZ, G. B. Técnicas imunológicas aplicadas à detecção de bactérias no ambiente. II. Uso de anticorpos como sondas em estudos de localização destes microrganismos presentes em amostras de solo e planta. **Embrapa-CNPAB**, Seropedica, 1997.

REIS JUNIOR, F. B. dos; TEIXEIRA, K. R. dos S.; REIS, V. M. Utilização das técnicas de ELISA e BIOLOG para estudos de biodiversidade intra-específica em isolados de *Azospirillum amazonense* associados a diferentes espécies de *Brachiaria*. **Embrapa Cerrados**, Planaltina, 2003.

REZENDE, S. S.; OLIVEIRA, M. E. S. de; DIDONET, C. C. G. M. **Bactérias Diazotróficas do gênero *Pseudomonas*: isolamento, diversidade e caracterização em plantas de arroz no cerrado de Goiás**. Disponível em: <http://www.prp.ueg.br/06v1/conteudo/pesquisa/inic-ien/eventos/sic2007/flashsic2007/arquivos/resumos/> Acesso em: Dez/2009.

RITCHIE, S.W.; HANWAY, J.; BENSON, G.O. **How a corn plant develops**, 1993. Disponível em: <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/library/maize/www.ag.iastate.edu/departments/agronomy/corngrows.html> Acesso em: Ago/2008.

RODRIGUES, L. da S.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.2, p.275-284, 2006.

ROESCH, L.F.; CAMARGO, F.; SELBACH, P.; SÁ, E.S. de; PASSAGLIA, L. Identificação de cultivares de milho eficientes na absorção de nitrogênio e na associação com bactérias diazotróficas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.924-927, 2005.

ROHLF, F.J. **NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York, Exeter Publishing, 1988.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.74, p.5463-5467, 1977.

SCHLOTTER, M.; LEBUHN, M.; HEULIN, T.; HARTMANN, A. A. Ecology and evolution of bacterial microdiversity. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Reviews**, v.24, p.647-660, 2000.

SILVA, F. de A. S. **The ASSISTAT Software: statistical assistance**. Cancun: American Society of Agricultural Engineers, 1996.

SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J. **Fundamentos de GENÉTICA**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 903 p.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. **MEGA4**: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.

TARRANT, J.J.; KRIEG, N.R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasiliense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v.24, n.8, p.967-980, 1978.

TERASAWA JUNIOR, F. **Implicações da interação genótipo-ambiente no melhoramento do milho no Estado do Paraná**. Tese (Doutorado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1884/7017>. Acesso em: Ago/2008.

TOLEDO, M. R. F.; FONTES, C. F.; TRABULSI, L. R. EPM-Modificação do meio Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase. **Revista de Microbiologia**, v.13, p.309-015.

UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUSHI, T. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequence. **Journal of Bacteriology**, v.177, n.5, p.1414-1417, 1995.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA. **Isolamento de microrganismos**. Disponível em: <http://www.microbiologia.ufba.br/aulas/Provas%20bioquimicas.doc>. Acesso em: Ago/2008a.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA. **Metabolismo microbiano**. Disponível em: <http://www.microbiologia.ufba.br/aulas/Metabolismos%20Microbiano.pdf>. Acesso em: Ago/2008b.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS. **Estrutura dos Ribossomos**. Disponível em: <http://www.icb.ufmg.br/prodabi/grupo6/estrutura.html>. Acesso em: Fev/2010.

WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Bactérias Diazotróficas em mudas de Bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.11, p.2277-2285, 2000.

APÊNDICE 1

TABELA COM RESULTADOS DE TODAS AS AMOSTRAS OBSERVADAS PARA CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.

| AMOSTRA | TAMANHO | COR | FORMA | BORDAS | ELEVAÇÃO | SUPERFÍCIE | CONSISTÊNCIA | TRANSPARÊNCIA | BRILHO | GRAM |
|--------------|------------|------|----------|--------|---------------|------------|--------------|---------------|-----------|----------|
| N1.3 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.B | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.6 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Positivo |
| N1.8 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.9 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.D | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.15 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.17 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.43 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.44 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.46 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.50 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lobada | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.51 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.60 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.64 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lobada | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.65 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.66 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lobada | Acuminada | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.70 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.72 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |

Continua

Continuação

| AMOSTRA | TAMANHO | COR | FORMA | BORDAS | ELEVAÇÃO | SUPERFÍCIE | CONSISTÊNCIA | TRANSPARÊNCIA | BRILHO | GRAM |
|---------|------------|------|-----------|--------|-----------------|------------|--------------|---------------|-----------|----------|
| N1.73 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.74 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.76 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.78 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.81 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lobada | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.82 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.83 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Positivo |
| N1.84 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Positivo |
| N1.85 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.86 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.89 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Positivo |
| N1.90 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Centro Saliente | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.91 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.92 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.93 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Positivo |
| N1.94 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.95 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.96 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| N1.97 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.98 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lobada | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.100 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lobada | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.101 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.102 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.103 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |

Continua

Continuação

| AMOSTRA | TAMANHO | COR | FORMA | BORDAS | ELEVAÇÃO | SUPERFÍCIE | CONSISTÊNCIA | TRANSPARÊNCIA | BRILHO | GRAM |
|---------|------------|------|-----------|--------|---------------|------------|--------------|---------------|-----------|----------|
| N1.104 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.105 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.107 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.108 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.109 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| N1.110 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.112 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.113 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lobada | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.115 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| N1.116 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.117 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.118 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.119 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.120 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| N1.121 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N1.122 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N2.1 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Positivo |
| N2.3 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Acuminada | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| N2.6 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| N2.7 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| N2.9 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Positivo |
| N2.12 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| N2.13 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N2.17 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |

Continua

Continuação

| AMOSTRA | TAMANHO | COR | FORMA | BORDAS | ELEVAÇÃO | SUPERFÍCIE | CONSISTÊNCIA | TRANSPARÊNCIA | BRILHO | GRAM |
|---------|------------|----------|-----------|--------|---------------|------------|--------------|---------------|-----------|----------|
| N2.18 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N2.20 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| N2.21 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N2.23 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| N2.24 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| N2.26 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Positivo |
| N2.32 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lobada | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| N2.33 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lobada | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| N2.35 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lobada | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| N2.37 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N2.40 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lobada | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| N2.42 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N2.45 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lobada | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| N2.48 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lobada | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| N2.49 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lobada | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| N2.51 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lobada | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| N2.54 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| N2.55 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lobada | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N2.57 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| N2.59 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lobada | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| N2.60 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| J1.58 | Puntiforme | Vermelha | Circular | Liso | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| J1.59 | Puntiforme | Vermelha | Circular | Liso | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| J1.60 | Puntiforme | Vermelha | Circular | Liso | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |

Continua

Continuação

| AMOSTRA | TAMANHO | COR | FORMA | BORDAS | ELEVAÇÃO | SUPERFÍCIE | CONSISTÊNCIA | TRANSPARÊNCIA | BRILHO | GRAM |
|---------|------------|--------------|-----------|----------|---------------|-------------|--------------|---------------|-----------|----------|
| J1.61 | Puntiforme | Vermelha | Circular | Liso | Covexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| J1.64 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lobado | Covexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| J1.65 | Puntiforme | Rosa | Circular | Liso | Covexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| J1.66 | Puntiforme | Rosa | Circular | Liso | Covexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| J1.67 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lobado | Covexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| J1.68 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lobado | Covexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| J1.69 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lobado | Covexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| J1.70 | Puntiforme | Vermelha | Circular | Liso | Covexa Alta | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| J1.71 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lobado | Covexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| J1.72 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lobado | Covexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| J2.25 | Puntiforme | Rosa | Circular | Liso | Covexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| J2.26 | Puntiforme | Rosa | Circular | Liso | Covexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| J2.28 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Denteado | Covexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| J2.29 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Denteado | Covexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| J2.30 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Denteado | Covexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L1.1 | Puntiforme | Vermelha | Circular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Gelatinosa | Transparente | Brilhante | Positivo |
| L1.4 | Grande | Roxa | Irregular | Lobada | Convexa Alta | Concêntrica | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L1.B | Grande | Roxa | Irregular | Lobada | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Positivo |
| L1.7 | Puntiforme | Vermelha | Circular | Lisa | Convexa Alta | Rugosa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| L1.8 | Puntiforme | Transparente | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Gelatinosa | Transparente | Brilhante | Positivo |
| L1.9 | Puntiforme | Vermelha | Irregular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Gelatinosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| L1.C | Puntiforme | Vermelha | Circular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Positivo |
| L1.10 | Puntiforme | Vermelha | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Positivo |
| L1.12 | Puntiforme | Vermelha | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |

Continua

Continuação

| AMOSTRA | TAMANHO | COR | FORMA | BORDAS | ELEVAÇÃO | SUPERFÍCIE | CONSISTÊNCIA | TRANSPARÊNCIA | BRILHO | GRAM |
|---------|------------|--------------|-----------|--------|---------------|------------|--------------|---------------|-----------|----------|
| L1.13 | Puntiforme | Vermelha | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L1.14 | Puntiforme | Transparente | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Gelatinosa | Transparente | Brilhante | Positivo |
| L1.15 | Puntiforme | Transparente | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Gelatinosa | Transparente | Brilhante | Positivo |
| L1.17 | Puntiforme | Vermelha | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L1.18 | Puntiforme | Vermelha | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L1.22 | Grande | Roxa | Irregular | Lobada | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L1.23 | Grande | Roxa | Irregular | Lobada | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L1.24 | Grande | Roxa | Irregular | Lobada | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L1.25 | Puntiforme | Vermelha | Irregular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L1.26 | Puntiforme | Transparente | Circular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Gelatinosa | Translúcida | Brilhante | Positivo |
| L1.33 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Gelatinosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| L1.35 | Puntiforme | Vermelha | Irregular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Positivo |
| L1.36 | Puntiforme | Vermelha | Irregular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L1.41 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Gelatinosa | Translúcida | Brilhante | Positivo |
| L1.42 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Gelatinosa | Translúcida | Brilhante | Positivo |
| L1.43 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Gelatinosa | Translúcida | Brilhante | Positivo |
| L1.44 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Gelatinosa | Translúcida | Brilhante | Positivo |
| L1.45 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Gelatinosa | Translúcida | Brilhante | Positivo |
| L1.47 | Puntiforme | Vermelha | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L1.48 | Puntiforme | Vermelha | Irregular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L1.49 | Puntiforme | Transparente | Irregular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Gelatinosa | Transparente | Brilhante | Positivo |
| L1.52 | Puntiforme | Vermelha | Irregular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L1.54 | Puntiforme | Vermelha | Irregular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Gelatinosa | Translúcida | Brilhante | Positivo |
| L1.55 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lobada | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Positivo |

Continua

Continuação

| AMOSTRA | TAMANHO | COR | FORMA | BORDAS | ELEVAÇÃO | SUPERFÍCIE | CONSISTÊNCIA | TRANSPARÊNCIA | BRILHO | GRAM |
|---------|------------|--------------|-----------|--------|---------------|-------------|--------------|---------------|-----------|----------|
| L1.58 | Puntiforme | Transparente | Circular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Gelatinosa | Transparente | Brilhante | Positivo |
| L1.63 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lobada | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| L1.73 | Puntiforme | Vermelha | Irregular | Lobada | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L1.75 | Puntiforme | Vermelha | Circular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L1.77 | Puntiforme | Transparente | Circular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Gelatinosa | Transparente | Brilhante | Positivo |
| L1.80 | Puntiforme | Transparente | Circular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Gelatinosa | Transparente | Brilhante | Negativo |
| L1.82 | Puntiforme | Transparente | Circular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Gelatinosa | Transparente | Brilhante | Negativo |
| L1.86 | Puntiforme | Vermelha | Circular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L1.87 | Puntiforme | Vermelha | Irregular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Gelatinosa | Translúcida | Brilhante | Positivo |
| L1.88 | Puntiforme | Vermelha | Circular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L1.93 | Puntiforme | Vermelha | Irregular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L1.98 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lobada | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L1.99 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lobada | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| L1.101 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lobada | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| L1.102 | Puntiforme | Vermelha | Irregular | Lobada | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| L1.103 | Puntiforme | Vermelha | Irregular | Lobada | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L1.104 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lobada | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| L1.105 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Gelatinosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| L1.106 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Gelatinosa | Translúcida | Brilhante | Positivo |
| L1.107 | Grande | Vermelha | Irregular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L1.108 | Puntiforme | Vermelha | Circular | Lisa | Convexa Alta | Concêntrica | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L1.109 | Grande | Vermelha | Irregular | Lobada | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L1.110 | Puntiforme | Vermelha | Circular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| L1.111 | Grande | Roxa | Irregular | Lobada | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |

Continua

Continuação

| AMOSTRA | TAMANHO | COR | FORMA | BORDAS | ELEVAÇÃO | SUPERFÍCIE | CONSISTÊNCIA | TRANSPARÊNCIA | BRILHO | GRAM |
|---------|------------|----------|-----------|--------|---------------|------------|--------------|---------------|-----------|----------|
| L1.112 | Puntiforme | Vermelha | Circular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L1.113 | Grande | Roxa | Irregular | Lobada | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| L1.114 | Puntiforme | Vermelha | Circular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L1.115 | Grande | Vermelha | Irregular | Lobada | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| L2.1 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Gelatinosa | Translúcida | Brilhante | Positivo |
| L2.2 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Gelatinosa | Translúcida | Brilhante | Positivo |
| L2.4 | Grande | Roxa | Irregular | Lobada | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| L2.5 | Grande | Roxa | Irregular | Lobada | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| L2.6 | Puntiforme | Vermelha | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L2.7 | Puntiforme | Vermelha | Circular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L2.8 | Puntiforme | Vermelha | Circular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L2.9 | Puntiforme | Vermelha | Circular | Lisa | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L2.10 | Grande | Roxa | Irregular | Lobada | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| L2.11 | Grande | Roxa | Irregular | Lobada | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| L2.12 | Grande | Roxa | Irregular | Lobada | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| L2.13 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Gelatinosa | Transparente | Brilhante | Positivo |
| L2.14 | Grande | Roxa | Irregular | Lobada | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L2.15 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Gelatinosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| L2.17 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| L2.19 | Grande | Roxa | Irregular | Lobada | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Positivo |
| L2.20 | Grande | Roxa | Irregular | Lobada | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| L2.21 | Grande | Roxa | Irregular | Lobada | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| L2.22 | Puntiforme | Vermelha | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Gelatinosa | Translúcida | Brilhante | Negativo |
| L2.24 | Puntiforme | Rosa | Circular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Gelatinosa | Translúcida | Brilhante | Positivo |

Continua

Continuação

| AMOSTRA | TAMANHO | COR | FORMA | BORDAS | ELEVAÇÃO | SUPERFÍCIE | CONSISTÊNCIA | TRANSPARÊNCIA | BRILHO | GRAM |
|----------------|----------------|------------|--------------|---------------|-----------------|-------------------|---------------------|----------------------|---------------|-------------|
| L2.25 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L2.26 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L2.27 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L2.28 | Puntiforme | Laranja | Irregular | Lobada | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L2.29 | Puntiforme | Laranja | Irregular | Lobada | Convexa Alta | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |
| L2.30 | Puntiforme | Rosa | Irregular | Lisa | Convexa Baixa | Lisa | Cremosa | Opaca | Brilhante | Negativo |

final

APÊNDICE 2

TABELA COM RESULTADOS DE TODAS AS AMOSTRAS OBSERVADAS PARA OS TESTES BIOQUÍMICOS.

| Amostras | Nº | Catalase | Urease | Fermentação | Nitrato | Fixação N | Dextrose | Frutose | Galactose | Lactato | Malato | Manitol | Sacarose | Amoxicilina 50µg ⁻¹ | Amoxicilina 150µg ⁻¹ | Amoxicilina 300µg ⁻¹ | Tetraciclina 50µg ⁻¹ | Tetraciclina 150µg ⁻¹ | Tetraciclina 300µg ⁻¹ |
|----------|----|----------|--------|-------------|---------|-----------|----------|---------|-----------|---------|--------|---------|----------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| L1.01 | 1 | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| L1.04 | 2 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| L1.12 | 3 | + | - | - | + | - | + | - | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| L1.13 | 4 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| L1.23 | 5 | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| L1.36 | 6 | + | - | - | - | - | + | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| L1.47 | 7 | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| L1.58 | 8 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - |
| L1.75 | 9 | + | - | - | + | - | + | + | + | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| L1.87 | 10 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| L1.88 | 11 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| L1.98 | 12 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| L1.99 | 13 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| L1.103 | 14 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | - | - |
| L1.107 | 15 | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| L1.108 | 16 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | - |
| L1.109 | 17 | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| L1.110 | 18 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | - | - |
| L1.111 | 19 | + | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| L1.113 | 20 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| L1.115 | 22 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| L2.02 | 23 | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| L2.04 | 24 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| L2.05 | 25 | + | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| L2.06 | 26 | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| L2.07 | 27 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| L2.08 | 28 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| L2.09 | 29 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| L2.10 | 30 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| L2.11 | 31 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| L2.12 | 32 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| L2.14 | 33 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| L2.19 | 35 | + | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| L2.20 | 36 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| L2.25 | 38 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| L2.28 | 39 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| L2.29 | 40 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| L1.101 | 41 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| L1.B | 42 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| L1.C | 43 | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N1.03 | 44 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N1.06 | 45 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N1.09 | 46 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N1.15 | 47 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N1.43 | 48 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N1.51 | 49 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| L1.114 | 21 | + | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + |
| L2.15 | 34 | + | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + |
| L2.21 | 37 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + |

continua

continuação

TABELA COM RESULTADOS DE TODAS AS AMOSTRAS OBSERVADAS PARA OS TESTES BIOQUÍMICOS.

| Amostras | Nº | Catalase | Urease | Fermentação | Nitrato | Fixação N | Dextrose | Frutose | Galactose | Lactato | Malato | Manitol | Sacarose | Amoxicilina 50µg/mL ⁻¹ | Amoxicilina 150µg/mL ⁻¹ | Amoxicilina 300µg/mL ⁻¹ | Tetraciclina 50µg/mL ⁻¹ | Tetraciclina 150µg/mL ⁻¹ | Tetraciclina 300µg/mL ⁻¹ |
|----------|----|----------|--------|-------------|---------|-----------|----------|---------|-----------|---------|--------|---------|----------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| J1.59 | 84 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| J1.60 | 85 | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| J1.61 | 86 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| J1.64 | 87 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| J1.65 | 88 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| J1.66 | 89 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - | + | - | - | - |
| J1.67 | 90 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| J1.68 | 91 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| J1.69 | 92 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| J1.70 | 93 | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| J2.25 | 94 | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| J2.26 | 95 | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - |
| J2.28 | 96 | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| J2.30 | 97 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - | - | - |
| N1.101 | 58 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N1.102 | 59 | + | - | + | + | - | + | + | + | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N1.103 | 60 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N1.105 | 81 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N1.107 | 82 | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N1.109 | 61 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N1.110 | 62 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| N1.113 | 63 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| N1.116 | 64 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N1.118 | 65 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| N1.119 | 66 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N1.34 | 83 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N1.64 | 50 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| N1.65 | 51 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| N1.70 | 52 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| N1.76 | 53 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N1.78 | 54 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N1.82 | 55 | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| N1.89 | 80 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N1.90 | 56 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| N1.96 | 57 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N2.03 | 67 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N2.06 | 68 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N2.07 | 69 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N2.12 | 70 | + | - | - | + | - | - | + | + | + | - | + | + | - | - | + | - | - | - |
| N2.20 | 72 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N2.23 | 73 | + | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N2.24 | 74 | + | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N2.32 | 75 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N2.37 | 76 | + | - | - | - | - | + | + | - | - | + | + | - | + | + | + | - | - | - |
| N2.40 | 77 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N2.45 | 78 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| N2.48 | 79 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| P1.92 | 99 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| P2.07 | 98 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |

Final

ANEXO I

ANÁLISE ESTATÍSTICA

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

| F.V. | G.L. | S.Q. | Q.M. | F |
|-------------|------|-----------|---------|------------|
| Fator1 (F1) | 6 | 2.98447 | 0.49741 | 0.8329 ns |
| Fator2 (F2) | 3 | 29.09284 | 9.69761 | 16.2388 ** |
| Int. F1xF2 | 18 | 2.95688 | 0.16427 | 0.2751 ns |
| Tratamentos | 27 | 35.03419 | 1.29756 | 2.1728 ** |
| Blocos | 5 | 37.93388 | 7.58678 | 12.7042 ** |
| Resíduo | 135 | 80.62019 | 0.59719 | |
| Total | 167 | 153.58825 | | |

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL: 3, 135 F-krit(1%) = 3.9293 F = 16.2388 $p < .00100$

GL: 18, 135 F-krit(1%) = .3362 F = .2751 $p = .00278$

GL: 27, 135 F-krit(1%) = 1.8826 F = 2.1728 $p = .002$

GL: 5, 135 F-krit(1%) = 3.1553 F = 12.7042 $p < .00100$

Fator 1 = Genótipos

Fator 2 = Meios

| Médias de bloco | | Médias do fator1 | | Médias do fator2 | |
|-----------------|-----------|------------------|-----------|------------------|-----------|
| 1 | 2.80941 a | 1 | 2.10413 a | 1 | 2.77349 a |
| 2 | 2.88973 a | 2 | 2.16550 a | 2 | 1.77937 b |
| 3 | 2.18716 b | 3 | 2.22924 a | 3 | 2.45365 a |
| 4 | 1.70934 b | 4 | 2.32879 a | 4 | 1.84887 b |
| 5 | 1.75994 b | 5 | 2.42205 a | | |
| 6 | 1.92751 b | 6 | 2.25942 a | | |
| | | 7 | 1.98779 a | | |
| DMSB = | 0.59748 | | | DMS2 = | 0.43910 |
| | | DMS1 = | 0.66743 | | |

Médias Fator 1 x Fator 2

| | | Fator 2 | | |
|---------|--------|---------|--------|--------|
| Fator 1 | | 1 | 2 | 3 |
| 1 | 2.7259 | | 1.6795 | 2.1442 |
| 2 | 2.5670 | | 1.6559 | 2.4134 |
| 3 | 2.8758 | | 1.8029 | 2.4158 |
| 4 | 2.8869 | | 1.8911 | 2.6818 |
| 5 | 2.9192 | | 1.9737 | 2.5131 |
| 6 | 2.6879 | | 2.0093 | 2.6654 |
| 7 | 2.7518 | | 1.4432 | 2.3419 |

| Continuação | |
|--------------------------|--------|
| Médias Fator 1 x Fator 2 | |
| ----- | |
| Fator 2 | |
| Fator 1 | ----- |
| 4 | |
| ----- | |
| 1 | 1.8670 |
| 2 | 2.0257 |
| 3 | 1.8225 |
| 4 | 1.8553 |
| 5 | 2.2823 |
| 6 | 1.6751 |
| 7 | 1.4142 |
| ----- | |

Não foi aplicado o teste de comparação de médias
por que o F de interação não foi significativo

PARA BLOCOS FATOR 1 FATOR 2...

As médias seguidas pela mesma letra não diferem
estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste
de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 2.21385 CV% = 34.90661

| DADOS | | | | | |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| ----- | | | | | |
| 3.5355 | 4.1833 | 2.5495 | 1.8708 | 2.3452 | 1.8708 |
| 3.5355 | 2.5495 | .7071 | .7071 | 1.8708 | .7071 |
| 4.0620 | 3.9370 | 1.5811 | 1.8708 | .7071 | .7071 |
| 3.6742 | 3.5355 | 1.8708 | .7071 | .7071 | .7071 |
| 2.7386 | 4.0620 | 2.7386 | 2.1213 | 1.8708 | 1.8708 |
| 3.6742 | 2.9154 | 1.2247 | .7071 | .7071 | .7071 |
| 3.6742 | 3.8078 | 2.5495 | 1.8708 | .7071 | 1.8708 |
| 3.2403 | 3.2403 | 1.8708 | 1.2247 | 1.8708 | .7071 |
| 3.2403 | 3.3911 | 3.2403 | 3.3911 | 1.8708 | 2.1213 |
| 3.2403 | 2.5495 | 1.2247 | .7071 | 1.2247 | 1.8708 |
| 2.3452 | 4.4158 | 2.1213 | 1.8708 | 1.8708 | 1.8708 |
| 1.8708 | 1.8708 | 1.8708 | 1.8708 | 1.8708 | 1.5811 |
| 3.3911 | 3.6742 | 3.2403 | 2.1213 | 2.3452 | 2.5495 |
| 3.2403 | 3.2403 | 1.5811 | .7071 | .7071 | 1.8708 |
| 2.5495 | 3.2403 | 2.3452 | 1.8708 | 2.5495 | 3.5355 |
| 2.1213 | 2.3452 | 2.3452 | 1.8708 | 1.2247 | 1.2247 |
| 3.2403 | 3.2403 | 2.9154 | 2.1213 | 2.9154 | 3.0822 |
| 3.2403 | 3.2403 | 3.2403 | .7071 | .7071 | .7071 |
| 2.3452 | 4.3011 | 2.3452 | 1.8708 | 1.8708 | 2.3452 |
| 2.3452 | 3.3911 | 2.3452 | 1.8708 | 1.8708 | 1.8708 |
| 2.5495 | 2.5495 | 2.5495 | 3.8078 | 2.5495 | 2.1213 |
| 2.3452 | 1.8708 | 3.3911 | .7071 | 1.8708 | 1.8708 |
| 3.2403 | 2.5495 | 2.3452 | 2.3452 | 2.1213 | 3.3911 |
| .7071 | .7071 | 2.5495 | 1.8708 | 1.8708 | 2.3452 |
| 2.5495 | 2.3452 | 2.7386 | 2.1213 | 3.6742 | 3.0822 |
| 2.9154 | .7071 | .7071 | .7071 | .7071 | 2.9154 |
| 2.3452 | 2.3452 | 2.3452 | 2.1213 | 2.5495 | 2.3452 |
| .7071 | .7071 | .7071 | 2.1213 | 2.1213 | 2.1213 |
| ----- | | | | | |

Para cálculo dos valores críticos de F e da probab.
de F calculado, o Assistat utiliza o Algoritmo 724
(Abernathy, Roger W. & Smith, Robert P. Algorithm
724: Program to calculate F-percentiles. ACM Trans.
Math. Softw. 19, No.4, 481-483(1993).)

ANEXO II

ANÁLISE DO SOLO

| Determinações | | | Valores |
|---------------|--------------------------------|-----------------------|---------|
| P | Fósforo | mg/dm ³ | 41 |
| M.O. | Matéria Orgânica | g/dm ³ | 60,51 |
| p H | p H | | 4,4 |
| H+Al | H+Al | mmolc/dm ³ | 147 |
| Al | Alumínio | mmolc/dm ³ | 21,5 |
| K | Potássio | mmolc/dm ³ | 1,6 |
| Ca | Cálcio | mmolc/dm ³ | 85 |
| Mg | Magnésio | mmolc/dm ³ | 37 |
| S.B. | Soma de Bases | mmolc/dm ³ | 123,8 |
| C.T.C. | Capacidade de Troca de Cátions | mmolc/dm ³ | 270,3 |
| V% | Saturação de Base | % | 46 |
| %Al CTC | % Saturação por Alumínio | % | 14,8 |
| ARGILA | Argila | g/kg | 510 |
| SILTE | Silte | g/kg | 391 |
| AREIA | Areia | g/kg | 99 |
| CF | Classificação Física | | Tipo 03 |
| B | Boro | mg/dm ³ | 1,42 |
| Cu | Cobre | mg/dm ³ | 0,6 |
| Fe | Ferro | mg/dm ³ | 436 |
| Mn | Manganês | mg/dm ³ | 1,22 |
| Zn | Zinco | mg/dm ³ | 0,3 |

Fonte: Fundação ABC (2009)